ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IV No 2

1 9 5 5

12 SEP. 1955

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie opublikowane.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin, Al. Racławicka 20.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie oraz angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski, niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie i rosyjskie lub polskie i angielskie (francuskie, niemieckie). Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora(ów), nazwę i adres zakładu w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania; c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne (nie dłuższe niż 15% tekstu).

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam, gdzie to możliwe, powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze istotne wyniki. Rysunki i wykresy należy sporządzać w dwukrotnym powiększeniu, tuszem na bristolu bez połysku — każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane, ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz nr rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem nru rysunku i wykresu. W objaśnieniach należy podawać powiększenie. Fotografie powinny być kontrastowe na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia) oraz dołączyć wykaz tablic i rysunków z podaniem numeracji i miejsca w tekście.

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Cienkowski (18,.) lub (Cienkowski 18,.). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887a. 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nr porządkowy, nazwisko i inicjały autora(ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwę czasopisma w przyjętych skrótach, tom, ewentualnie zeszyt, stronicę czasopisma: w wypadku zaś cytowania książki, wydanie, miejsce i firmę wydawcy, ewentualnie stronicę tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml a nie ccm, g — a nie gr, 100^0 — a nie 100^0C, M-molarny, N-normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu „stężenie %" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich.

W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują *Acta* bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 28.— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja Acta Mikrobiol. Polon., Lublin, Al. Racławicka 20).

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IV No 2

1955
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek tytularny PAN— Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Adolf Joszt — Gliwce, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Lublin, Eugeniusz Pijanowski — członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa.

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Sekretarz Redakcji — Kazimierz Dygdała

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — DZIAŁ CZASOPISM
WARSZAWA, ULICA KRAKOWSKIE PRZEDMIEŚCIE Nr 79

Nakład 1.227+104 egz.	Oddano do składania 10.3.55.
Ark. wyd. 7,6. Ark. druk. 5,5.	Podpisano do druku 25.5.55
Papier bedrz. III kl., 80 g, 70×100/16	Druk ukończono w maju 1955.
Cena zł 10.—	Zam. 316c/55. B-6-7019

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

D. Iwanicka i Z. Kwiatkowski

OBSERWACJE NAD POWSTAWANIEM FORM *L* U *SHIGELLA DYSENTERIAE*

KOMUNIKAT

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie
Wpłynęło dnia 25.I.1955

Obserwacje Klieneberger, Dienesa, Freundta i innych wykazały, że bakterie w pewnych warunkach przechodzić mogą w tak zwaną fazę *L*.

Charakteryzuje się ona tworzeniem na agarze odżywczym mikrokolonii złożonych z ziarnistości od około 0,2 μ do 1 μ i dużych kulistych form o średnicy około 5 μ.

Postacie kuliste zwane często dużymi ciałami lub komórkami olbrzymimi zajmują brzeżne części kolonii. Bakterie w fazie *L* dają się pasażować, a w pewnych warunkach ulegają rewersji do postaci normalnych. Dokładne wiadomości o tym zagadnieniu znaleźć można w pracach przeglądowych Dienesa (1951), Kłyszejko (1953) i Pieszkowa (1954).

Znajomość cyklu *L* u bakterii oparta jest na obserwacjach przeprowadzonych na kilku gatunkach. Najwięcej prac poświęcono formom *L* u *Streptobacillus moniliformis, Proteus, Escherichia coli, Salmonella.*

W ramach badań Zakładu Mikrobiologii Ogólnej w Lublinie nad problemem cyklu *L* podjęto próbę otrzymania wzrostu w fazie *L Shigella dysenteriae.*

Do obserwacji użyto 7 szczepów świeżo wyizolowanych (4 szczepy Flexner, 1 Shiga i 2 Sonnei) oraz czterech starych szczepów muzealnych (2 szczepy Flexner i 2 Shiga).

Z czynników powodujących przemianę bakterii w formy *L* przebadano penicylinę. Zastosowano również chloromycetynę, surowicę swoistą i wieloważny bakteriofag.

Badając wpływ penicyliny, chloromycetyny i surowicy swoistej, dodawano je do podłoża stałego. Stężenie penicyliny, zależnie od serii doświadczenia, wynosiło: 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 i 2000 jednostek międzynarodowych penicyliny krystalicznej G produkcji polskiej na 1 ml pożywki.

Badając wpływ chloromycetyny, dodawano ją w ilości 0,0004, 0,004 i 0,02 μg na 1 ml podłoża. Chloromycetyna wyprodukowana była w Zakładzie Chemii Organicznej UMCS w Lublinie.

Działanie surowicy swoistej obserwowano zarówno na podłożu stałym jak i płynnym. W pierwszym przypadku stosowano 1,5% agar z 20% surowicy swoistej. W drugim przypadku przetrzymywano bakterie w surowicy swoistej rozcieńczonej w stosunku: 1:2, 1:10, 1:40 i 1:80 przez okres 2, 4 i 24 godzin w temperaturze 37°. Po odpowiednim czasie z każdego rozcieńczenia wysiewano zawiesinę na podłoże stałe z dodatkiem 20% normalnej surowicy końskiej.

Używane surowice swoiste dawały odczyny aglutynacyjne ze szczepem Flexner w rozcieńczeniu 1 : 5000, Shiga 1 : 2000 i Sonnei 1 : 100.

Przeprowadzono również obserwacje nad wpływem bakteriofaga na przechodzenie pałeczek czerwonki w fazę *L*. W tym celu do 4-godzinnej hodowli bakterii na bulionie odżywczym dodawano około 20% zawiesiny wieloważnego bakteriofaga czerwonkowego o mianie 10^{-6}. Po 4, 8 i 24 godzinach wysiewano zawiesinę bulionową na podłoże stałe z 20% normalnej surowicy końskiej.

Wyniki działania penicyliny, chloromycetyny, surowicy swoistej i bakteriofaga sprawdzano, przeprowadzając bezpośrednie obserwacje na podłożu stałym przy użyciu średnich powiększeń mikroskopu.

W przypadku zaobserwowania charakterystycznych mikrokolonii, sporządzono preparaty odciskowe, stosując metodę opisaną przez Kuhna (1931) i Klieneberger (1935).

WYNIKI OBSERWACJI.

W pierwszym etapie pracy badano działanie penicyliny w różnych koncentracjach na pałeczki czerwonki. Stwierdzono, że pod wpływem penicyliny w stężeniu 10 i 20 jednostek na 1 ml podłoża większość bakterii ulega znacznemu wydłużeniu. Powstają formy nitkowate o długości do 60 μ. Niektóre z tych nitek pęczniejąw części środkowej, tworząc w ten sposób postacie wrzecionowate. Oprócz form nitkowatych stwierdza się pałeczki ułożone w długie łańcuszki oraz nieliczne twory kuliste o średnicy 5 μ i więcej. Opisane zmiany morfologiczne zachodzą już w ciągu 12 godzin hodowli w 37°. Przedłużając inkubację, stwierdza się stopniowe przerastanie podłoża postaciami pałeczkowatymi. Obserwacje ciągłe wykazały, że pałeczki powstają na drodze fragmentacji form nitkowatych oraz przez rozpad łańcuszków na poszczególne elementy. Nie udało się natomiast prześledzić losów tworów kulistych. Przy stosowaniu wyższych stężeń penicyliny proces przemian morfologicznych przebiegał odmiennie.

Jakkolwiek ostateczny rezultat działania był różny w zależności od jej stężenia, to jednak początkowe stadia były podobne zarówno przy 50 jak 2000 jednostek penicyliny na 1 ml pożywki.

Stwierdzono, że po wysianiu na podłoże stałe z penicyliną w stężeniu wyższym niż 20 jednostek pałeczki czerwonki w pierwszej godzinie inkubacji ulegają podziałowi. W wyniku tego podziału pojawiają się na powierzchni drobne pałeczki. Tworzą one często krótkie łańcuszki złożone z dwu lub czterech komórek. Dalszy rozwój przebiega już odmiennie niż na podłożu bez penicyliny. Nie następuje wydłużenie pałeczek, tylko ich pęcznienie — powstają duże ciała. Średnica tych form

kulistych w 12-to godzinnej hodowli wynosi około 2 — 3 μ. Duże ciała początkowo mają wyraźną błonę, wnętrze ich jest zbite, bez ziarnistości. W miarę wzrostu następuje rozluźnienie cytoplazmy, pojawiają się w niej wakuole oraz ziarnistości. W 24-godzinnej hodowli średnica niektórych form kulistych wynosi ponad 10 μ. W tym stadium są one zwykle zwakuolizowane, a cytoplazma tworzy tylko wąskie obrzeżenie. Po pewnym czasie twory te pękają. Nie wszystkie jednak duże ciała zmieniają się w ten sposób. Większość nie ulega tak znacznemu powiększeniu, średnica ich nie przekracza zwykle 4 — 5 μ. Formy kuliste tego typu tworzą różnej wielkości nieregularne skupienia. Opisany proces przebiega tak samo przy 50, 100, 200, 500, 1000 i 2000 jednostek penicyliny (Rys. 1, 2 i 3).

Rys. 1

Rys. 2

Rys. 1. Pałeczki czerwonki zmienione pod wpływem penicyliny w stężeniu 10 jednostek na 1 ml podłoża. 12-godzinna hodowla na agarze.

Rys. 2. 5-godzinna hodowla *Shigella dysenteriae* na agarze z penicyliną w stężeniu 500 jednostek na 1 ml podłoża.

Рис. 1. Палочки дизентерии видоизменные под влиянием пенициллина в концентрации 10 единиц на 1 мл среды. 12-ти часовая культура на агаре.

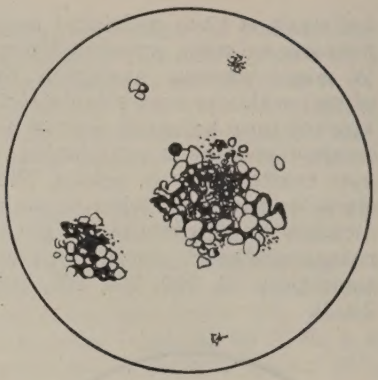
Рис. 2. 5-и часовая культура *Shigella dysenteriae* на агаре с пенициллином в концентрации 500 единиц на 1 мл субстрата.

Fig. 1. Morphological changes in *Shigella dysenteriae* on agar medium containing 10 I. U. of penicillin per 1 ml. Culture at 12 hr.

Fig. 2. Morphological changes in *Sh. dysenteriae* in the presence of 500 I. U. of penicillin per 1 ml. Culture at 5 hr.

O ile jednak przy koncentracjach do 500 jednostek penicyliny dalsze zmiany mają już charakter wyraźnie degeneratywny, to przy stężeniach wyższych proces przemian morfologicznych przebiega dalej. W rezultacie powstają mikrokolonie typu *L* (Rys. 4).

Rys. 3



Rys. 4

Rys. 3. Skupienie dużych ciał na agarze z 2000 jednostek penicyliny na 1 ml podłoża.

Rys. 4. 48-godzinne kolonie typu *L. Shigella dysenteriae* z 2000 jednostek penicyliny na 1 ml podłoża.

Рис. 3. Скопление больших телец на агаре с 2000 единиц пенициллина на 1 мл субстрата.

Рис. 4. Двусуточные колонии типа L. *Shigella dysenteriae* с 2000 единиц пенициллина на 1 мл питательной среды.

Fig. 3. Large bodies on the agar-serum medium + 2000 I. U. of penicillin per 1 ml.

Fig. 4. *L*-colonies of *Sh. dysenteriae*. Medium containing 2000 I. U. of penicillin per 1 ml. Culture at 48 hr.

Niewielkie skupienia form ziarnistych widoczne są już po około 24 godzinach hodowli. Jak przekonano się, jest to najmłodsze stadium rozwoju kolonii *L* jakie udało się zaobserwować.

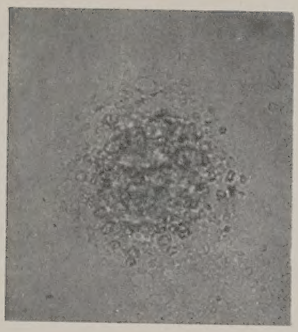
Z jakich elementów powstają te ziarnistości — nie stwierdzono. Dojrzałe mikrokolonie widoczne są najwcześniej po 48 godzinach. Średnica ich wynosi wtedy około 100 μ. Część centralna składa się z ziarnistej masy o bardzo nieregularnych zarysach. Obserwując preparaty odciskowe stwierdzono, że ziarnistości wchodzące w skład mikrokolonii barwią się dobrze błękitem karboltoluidynowym i barwikiem Giemzy. Średnica najmniejszych widzialnych form wynosi około 0,5 μ. W brzeżnych częściach kolonii widoczne są skupienia dużych kulistych ciał o średnicy 4 — 5 μ.

Porównując kolonie *L* u *Shigella* z opisem mikrokolonii innych gatunków, stwierdzono znaczne podobieństwo morfologiczne (Fot. 1, 2 i 3).

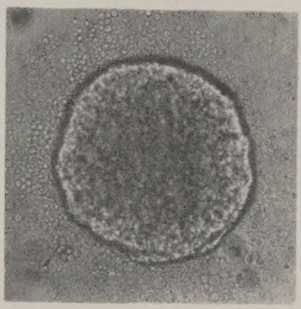
Jedyną zauważoną różnicą był mniej regularny zarys środkowej ziarnistej części kolonii *L* w przypadku *Shigella dysenteriae.*

Po zbadaniu wpływu penicyliny na przechodzenie pałeczek czerwonki w formy *L* dalsze prace poszły w kierunku stwierdzenia, czy pow-

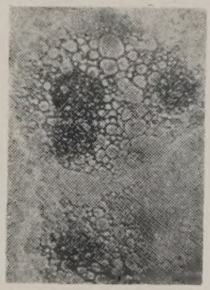
1



2



3



Fot. 1. 48-godzinna mikrokolonia *L Shigella dysenteriae* na miękkim agarze z 20% surowicy końskiej. Powiększenie 50 ×

Fot. 2. 60-godzinne mikrokolonie *L Proteus vulgaris* na agarze miękkim z 25% surowicy końskiej. Powiększenie 100 × (z nieopublikowanej pracy A. Sander i M. Tabaczyński)

Fot. 3. 72-godzinne mikrokolonie *L Salmonella typhi* na agarze miękkim z 20% surowicy końskiej. Średnica mikrokolonii około 100 μ (z pracy Dienesa L. 1951).

Фот. 1. Двусуточная микроколония *L. Shigella dysenteriae* на мягком агаре с 20% лошадиной сыворотки. Увелич. 50 х.

Фот. 2. 60-и часовые микроколонии *L Proteus vulgaris* на мягком агаре с 25% лошадиной сыворотки. Увеличь 100 х (из неопубликованной работы А. Сандер и М. Табачинского)

Фот. 3. Трехсуточные микроколонии *L Salmonela typhi* на мягком агаре с 20% лошадиной сыворотки. Диаметр микроколоний около 100 μ (Из работы Динеса L. 1951).

Phot. 1. *L*-colony of *Shigella*. Soft serum agar. 100 ×

Phot. 2. *L*-colonies of *Proteus vulgaris*. Soft serum agar. 100 ×

Phot. 3. *L*-colonies of *Salmonella typhi*. (from Dienes, 1951).

stałe mikrokolonie dają się pasażować i czy nie ulegają rewersji do postaci pałeczkowatych. Wynik pozytywny świadczyłby o tym, że albo duże ciała, albo formy ziarniste są zdolne do reprodukcji. Nie udało się jednak ani pasażować kolonii *L*, ani nie stwierdzono ich rewersji do pałeczek. Nie otrzymano również form *L* z *Shigella dysenteriae* przy działaniu surowicą swoistą, bakteriofagiem i chloromycetyną.

Zmiany morfologiczne zachodzące pod wpływem tych czynników prowadziły do powstawania dużych ciał, podobnie jak przy działaniu penicyliny. Były one jednak znacznie mniej liczne i ulegały szybko rozpadowi.

Д. Иваницка и З. Квятковски

НАБЛЮДЕНИЯ НАД ОБРАЗОВЫВАНИЕМ ФОРМ *L* У *SHIGELLA DYSENTERIAE*

Резюме

Авторы занялись исследованием влияния пенициллина, хлоромицетина, специфической иммунной сыворотки и бактериофага на образование форм *L* у *Shigella dysenteriae*.

L формы были получены исключительно при применении пенициллина в концентрации свыше 1000 единиц на 1 мл среды (фот. 1, 2, 3).

Пересевы микроколоний типа *L* не удавались. Не обнаружено также реверсии к палочкам.

Под влиянием пенициллина в концентрации ниже 1000 единиц а также хлоромицетина, специфической иммунной сыворотки и бактериофага возникали исключительно гигантические клетки.

D. Iwanicka and Z. Kwiatkowski

SOME OBSERVATIONS ON THE *L* FORMS IN *SHIGELLA*

Summary

The effect of penicillin, of chloromycetin, of specific immune serum and of bacteriophage on 7 strains of *Shigella (S. Shigae, S. Sonne, S. Flexner)* was studied.

The growth in the *L*- form appeared only on media with penicillin added in concentration above 1000 I. U. per 1 ml.

No reversion to the rods was observed and no growth was obtained after transfering the culture to fresh medium.

Only large round bodies were formed in the presence of chloromycetin, of anti-*Shigella* serum, *Shigella*-bacteriophage and of penicillin in concentrations below 1000 I. U. per 1 ml.

The morphology of *Shigella L*-colonies is different from this of Proteus *L*-form (Phot. 1, 2 and 3).

LITERATURA

1. Dienes L., Weinberger H. J., 1951: The *L* forms of bacteria, *Bact. Rev.*, **15** : 245.

2. K l i e n e b e r g e r E., 1935: The colonial development of the organisms of pleuropneumonia and agalactia in serum agar and variations of the morphology under different conditions of growth., *J. Path. Bact.*, **39** : 40.
3. K ł y s z e j k o L., 1953: Zagadnienie postaci *L* drobnoustrojów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, **7** : 198.
4. K u h n P h., S t e r n b e r g K., 1931: Ueber Bakterien und Pettenkoferien., *Zbl. Bakt.*, I. *Orig*, **121** : 114.
5. P i e s z k o w M. A., 1954: O tak nazywajemych *L* formach bakterij., *Mikrobiologija*, **23** : 607.

Z. Kwiatkowski

MIKROORGANIZMY GRUPY PLEUROPNEUMONII

МИКРОБЫ ГРУППЫ ПЕРИПНЕВМОНИИ (ОБЗОР)

PLEUROPNEUMONIALIKE ORGANISMS (A REVIEW)

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie

Wpłynęło dnia 24.I.1955

Pierwsze obserwacje nad etiologią pleuropneumonii bydła dokonane zostały przez Pasteura.

Stwierdził on, że czynnik zakaźny powodujący to schorzenie jest niewidoczny przy użyciu mikroskopu świetlnego i nie da się go hodować na zwykłym bulionie odżywczym.

W roku 1898 Nocard i Roux (wg Edwarda 1952) otrzymali wzrost zarazków pleuropneumonii. Zastosowali oni metodę hodowli w woreczkach kolodionowych umieszczanych w jamie otrzewnowej królika. W woreczkach znajdował się bulion zakażony limfą chorego zwierzęcia. Wzrost można było stwierdzić najwcześniej po dwóch tygodniach. Dalsze badania wykazały, że hodowlę otrzymać można nie tylko w woreczkach wszczepionych w organizm zwierzęcy, lecz również na podłożach stałych i płynnych wzbogaconych surowicą bydlęcą lub końską.

Opracowanie metod hodowli zarazków pleuropneumonii umożliwiło poznanie ich morfologii, gdyż wszystkie dotychczasowe próby wykrycia przy pomocy mikroskopu tych mikroorganizmów w materiale zakaźnym dawały wyniki negatywne.

Pierwsze obserwacje nad morfologią bydlęcej pleuropneumonii pochodzą od Bordeta, który w roku 1910 w preparatach z hodowli na agarze z krwią króliczą, barwionych Giemzą, zauważył formy o różnej wielkości i kształcie (wg Dienesa 1945). Niezależnie od Bordeta, w tym samym roku Borrel i współpracownicy (wg Sabina 1941 a) przeprowadzili dokładne badania morfologii tych mikroorganizmów. Stwierdzili oni, że w hodowli występują drobne ziarnistości, większe formy kuliste oraz nitki.

Dzięki pracom Nowaka (1929), Ørskova (wg Sabina 1941 a), Wróblewskiego (1931, 1933), Klieneberger (1935) poznane zostały przyczyny tego polimorfizmu. Okazało się, że drobnoustroje bydlęcej pleuropneumonii przechodzą w czasie hodowli na podłożach sztucznych przez cykl przemian morfologicznych i tym właśnie tłumaczy się obecność różnych postaci.

Zainteresowanie mikroorganizmami pleuropneumonii wzrosło po wykryciu nowych przedstawicieli tej grupy.

I tak w 1923 B r i d r e i D o n a t i e n (wg E d w a r d a 1954) stwierdzili, że zakaźna bezmleczność kóz i owiec powodowana jest przez drobnoustroje podobne do wywołujących u bydła pleuropneumonię.

W roku 1934 S h o e t e n s a c k (wg M o r t o n a, S m i t h a i L e b e r m a n a 1951) wyizolował z wydzieliny nosowej, płuc i śledziony psów chorych na nosówkę formy nieodróżnialne morfologicznie od zarazków bydlęcych.

W latach następnych podobne organizmy wyhodowano z różnych narządów myszy i szczurów (wg S a b i n a 1941 a).

U ludzi po raz pierwszy obecność mikroorganizmów podobnych do bydlęcej pleuropneumonii stwierdzili D i e n e s i E d s a l l w 1937 roku (wg M o r t o n a, S m i t h a i K e l l e r a 1952). Otrzymali oni czystą hodowlę tych drobnoustrojów z gruczołu Bartholiniego.

Obserwacje D i e n e s a i E d s a l l a rozpoczęły okres intensywnych poszukiwań podobnych drobnoustrojów w organiźmie ludzkim.

Drobnoustroje podobne do zarazków bydlęcych występują również poza organizmem bydlęcym i ludzkim.

L a i d l o w i E l f o r d (1936) wyizolowali mikroorganizmy zbliżone do zwierzęcych i ludzkich ze ścieków kanalizacyjnych, a S e i f f e r t (1937 a, b) z gleby, kompostu i nawozu. Omawiana grupa drobnoustrojów jest więc reprezentowana w przyrodzie przez licznych przedstawicieli. Wszystkie te formy, zarówno zwierzęce, ludzkie, glebowe i ściekowe nazywane są w literaturze pleuropneumoniopodobnymi (*pleuropneumonialikeorganisms*). W dalszym ciągu pracy stosowany będzie skrót — **oppp.**

Fakt ten, że zarówno w organizmach żywych jak i poza nimi występują formy różniące się znacznie od znanych dotąd grup drobnoustrojów, wzbudził zainteresowanie wielu mikrobiologów.

I. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ORGANIZMÓW PLEUROPNEUMONIOPODOBNYCH

MORFOLOGIA.

Wiadomości o morfologii **oppp** oparte są prawie wyłącznie na obserwacjach dokonanych na podłożach sztucznych. W materiale pobranym z organizmu chorego, np. w limfie, krwi, wymazach z dróg rodnych czy w tkankach nie udaje się zasadniczo wykazać mikroskopowo czynnika zakaźnego. Prawdopodobnie przyczyną tego są zbyt małe rozmiary niektórych elementów i zbyt duża wielopostaciowość innych, by można je było odróżnić od tworów wewnątrzkomórkowych bądź to ziarnistości różnego pochodzenia, znajdujących się w płynach ustrojowych czy wymazach.

Obserwacje w materiale zakaźnym utrudnia również ten fakt, że **oppp** barwią się bardzo słabo barwikami anilinowymi, używanymi w codziennej technice bakteriologicznej. Konieczność zastąpienia zasadowych, silnie barwiących bakterie barwików, takich jak fiolet krystaliczn-

ny czy fuksyna, innymi np. barwikiem Giemzy, uniemożliwia należyte różnicowanie tych drobnoustrojów od elementów środowiska. Można przypuszczać, że po opracowaniu odpowiedniej metody barwienia, trudności związane z wykazaniem organizmów grupy pleuropneumonii w zakażonych tkankach czy płynach zostaną znacznie zmniejszone.

Obserwacje morfologiczne na podłożach sztucznych są również utrudnione. Wpływa na to przede wszystkim nieprzydatność techniki wykonywania rozmazów z hodowli. Przyczyną tego jest bardzo delikatna budowa i brak sztywnej błony, na skutek czego **oppp** ulegają deformacji przy rozmazywaniu, wysychaniu i utrwalaniu preparatu.

Znajomość morfologii tej grupy mikroorganizmów oparta jest na bezpośrednich obserwacjach hodowli nieutrwalanych, niebarwionych lub barwionych, lub też na stosowaniu techniki preparatów odciskowych.

Hodowle zarówno na podłożach stałych jak i płynnych składają się z małych tworów ziarnistych, zwanych często ciałkami elementarnymi. Wielkość ich waha się od około 125 do 250 mμ. Oprócz tych form w hodowlach starszych pojawiają się postacie kuliste, zwane dużymi ciałami, o średnicy od około 1 μ do kilkunastu mikronów. Duże ciała w miarę starzenia się ulegają często wakuolizacji. O ile jedna duża wakuola zajmie całe wnętrze, pozostawiając tylko wąskie obrzeżenie protoplazmatyczne, powstają charakterystyczne postacie pierścieniowate.

Poza ziarnistościami i tworami kulistymi u niektórych gatunków, a zwłaszcza u drobnoustrojów bydlęcej pleuropneumonii, bezmleczności kóz i owiec, w szczepach glebowych i ściekowych — pojawiają się jeszcze formy nitkowate, dochodzące do kilkudziesięciu mikronów długości.

W szczepach ludzkich nitki występują rzadziej, czasem dopiero w starych hodowlach.

W jaki sposób powstają tak różnorodne formy? Nie ulega dziś wątpliwości, że **oppp** przechodzą na podłożach sztucznych określony, pełny cykl rozwojowy.

Liczni badacze tego procesu nie są jednak zgodni co do jego przebiegu.

Według F r e u n d t a (1952, 1953) jedynie ciałka elementarne i formy nitkowate są reproduktywne. Pierwsze rozmnażają się przez podział i z nich też kiełkują nitki, które na drodze segmentacji dają z powrotem ziarnistości. Duże ciała są natomiast tworami degeneratywnymi, nie ulegającymi dalszemu rozwojowi.

Według innych badaczy (K l i e n e b e r g e r 1935, 1940, D i e n e s 1945) duże ciała, podobnie jak ciałka elementarne, są zdolne do reprodukcji. Z form ziarnistych powstają przez pęcznienie postacie kuliste, które przez wielokrotny podział rozpadają się na liczne ciałka elementarne. Formy ziarniste mogą rozwijać się również w nitki. Wszystkie te elementy występują zarówno na podłożach stałych jak i płynnych. Stwierdzenie w hodowli obecności postaci ziarnistych, kulistych, pierścieniowych ewentualnie nitkowatych, jest więc zasadniczą cechą diagnostyczną.

Szczególnie charakterystyczny jest wzrost **oppp** na podłożach stałych. Rosną one w postaci mikrokolonii, których średnica waha się, w zależności od gatunku i wieku hodowli, od 20 do około 500 μ. Kolonia w części środkowej składa się z form ziarnistych wrastających w podłoże, brzegi zajmują duże kuliste ciała. Środek kolonii jest lekko wzniesiony. Wygląd mikrokolonii jest najważniejszą cechą diagnostyczną **oppp** (Fot. 1 Tab.).

Na podłożach płynnych mikroorganizmy te rosną bardzo powoli. Szczególnie trudno otrzymać hodowlę szczepów ludzkich. W przypadku wyizolowania **oppp** z materiału zakaźnego czasami dopiero po kilkunastu dniach pojawia się bardzo słabe zmętnienie pożywki. Często, widoczny wzrost może w ogóle nie nastąpić w pierwszym wysiewie. Konieczne jest wtedy stosowanie tak zwanych „ślepych pasaży".

Szczepy zaadaptowane do podłoży sztucznych rozwijają się po przesiewie już po 24 — 48 godzinach. Mikroorganizmy pleuropneumoniopodobne na pożywkach płynnych tworzą zmętnienie, a w starych hodowlach może powstawać kożuszek złożony przeważnie z postaci nitkowatych. Znajomość morfologii **oppp** oparta jest więc na obserwacjach przeprowadzanych na podłożach sztucznych. Wiadomości o wyglądzie tych mikroorganizmów w ustroju zakażonym są bardzo nieliczne i często niepewne.

S a b i n (1941 a) stwierdził obecność ziarnistości wewnątrzcytoplazmatycznych w komórkach mezotelialnych jamy otrzewnowej myszy zakażonej **oppp.** Przypuszczał on, że są to ciałka elementarne. Podobne formy opisano kilkakrotnie w komórkach tkanek zakażonych myszy i szczurów (wg S a b i n a 1941a i E d w a r d a 1954).

Występowanie dużych ciał w płynie mózgo-rdzeniowym pacjenta, w przypadku ropnia mózgu i *meningitis*, stwierdzili C a r l s o n, S p e c t o r i D o u g l a s (1951). Z płynu mózgo-rdzeniowego wyhodowali oni typowe mikrokolonie **oppp.**

PRZESĄCZALNOŚĆ oppp.

Doświadczenia z sączeniem hodowli i zakażonych płynów ustrojowych wykazały przechodzenie najdrobniejszych ciałek elementarnych przez sączki bakteriologiczne. Okazało się, że filtraty chorobotwórczych **oppp** są nadal zakaźne. Do sączenia używano świec Berkefelda N i odpowiednich błon gradokolowych.

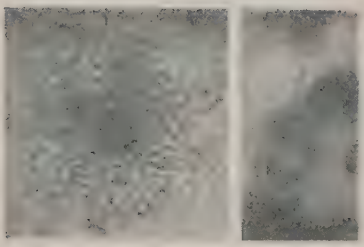
Dokładne badania przeprowadzono na szczepach pleuropneumonii bydlęcej, bezmleczności kóz, zapalenia płuc myszy i na szczepach glebowych (wg S a b i n a 1941 a, E d w a r d a 1954).

Stosując metodę filtrowania, ustalono wymiary najmniejszych form wchodzących w skład hodowli **oppp**. Wymiary ich wahają się od 125 do 165 mμ. Wyniki te potwierdzone zostały przy pomocy obserwacji dokonanych w mikroskopie elektronowym (D i e n e s, 1953) (Fot. 2 Tabl.).

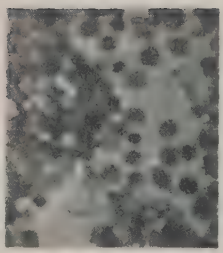
WYMAGANIA WZROSTOWE.

Podłoże podstawowe do hodowli **oppp** składa się z agaru odżywczego lub bulionu odżywczego. Najczęściej stosuje się 1,5% agar odżywczy. Zbyt twarde podłoże stale wpływa niekorzystnie na rozwój niektórych

1



2



Fot. 1. Mikrokolonie ludzkiego szczepu **oppp** na agarze z surowicą.
a. powiększenie 150 ×
b. „ 100 × (z pracy D i e n e s i W e i n b e r g e r, 1951)

Fot. 2. Szczep ludzki **oppp.** Ciałka elementarne. Preparat odciskowy hodowli agarowej. Zdjęcie wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego. Powiększenie 6.200 × (z pracy D i e n e s a, 1953)

oppp. Według obserwacji M o r t o n a i współpracowników (1952), dużą rolę odgrywa rodzaj peptonu dodawanego do agaru lub bulionu. Przy izolowaniu **oppp** z materiału zakaźnego należy więc i na ten czynnik zwrócić uwagę.

Drobnoustroje z grupy pleuropneumonii nie rosną jednak na samym agarze i bulionie odżywczym. Do wzrostu wymagają substancji wzbogacających. Zwykle używa się w tym celu *ascites* lub surowicy zwierzęcej, najczęściej końskiej. Zamiast surowicy czy *ascites* można używać również wyciągu wodnego krwinek bydlęcych. Przekonano się, że surowice różnych zwierząt nie są jednakowo efektywne (E d w a r d 1954). Niektóre szczepy ludzkie nie rosną zupełnie na podłożach z surowicą króliczą. Najlepsze wyniki uzyskuje się przy stosowaniu surowicy końskiej lub ludzkiej. S m i t h i M o r t o n (1951) uważają, że czynnikiem wzbogacającym jest małocząsteczkowe białko zawarte we frakcji A surowicy bydlęcej. Odmienny pogląd reprezentuje E d w a r d i F i t z g e r a l d (1951 b). Uzyskali oni wzrost mikroorganizmów pleuropneumoniopodobnych na podłożach odżywczych z dodatkiem cholesterolu lub innych steroli. Ich zdaniem właśnie te substancje zawarte w surowicy, *ascites*, czy wyciągu z krwinek — są niezbędne dla wzrostu **oppp.**

K l i e n e b e r g e r i D i e n e s zalecają dodawanie, oprócz surowicy, wyciągu wodnego z gotowanych krwinek, a B e v e r i d g e (wg E d w a r d a 1954) — wyciągu z wątroby.

E d w a r d (1954) stwierdził, że korzystne jest wzbogacanie podłoża filtratem hodowli paciorkowców lub wyciągiem drożdżowym.

Dodatek różnych cukrów w pewnych przypadkach wzmaga wzrost, w innych — nie (S a b i n 1941 a). Zahamowanie wzrostu, obserwowane w obecności pewnych cukrów, wiąże się prawdopodobnie z zakwaszeniem podłoża w przypadku fermentowania danego węglowodanu.

Jak okazało się rozwój **oppp** zachodzi najlepiej przy pH — 7,8 — 8,0. Podwyższenie stężenia jonów wodorowych osłabia wzrost.

Hodowle tych drobnoustrojów uzyskano nie tylko na podłożach sztucznych, lecz również na żywych tkankach — na zarodkach kurzych (E d w a r d 1954).

S u l l i v a n i D i e n e s (wg S a b i n a 1941 a) stwierdzili natomiast, że wzrost mysiego szczepu pleuropneumonii zachodzi tylko na embrionach zabitych przez oziębienie do 4°. Również S w i f t (wg S a b i n a 1941 a), pracując nad innymi szczepami wyhodowanymi z myszy, uzyskał lepszy wzrost na zarodkach zabitych przez obniżenie temperatury.

S a b i n (1941 a) używał do hodowli szczepu mysiego typ *B* podłoża złożonego z 0,1 ml zmielonej tkanki zarodka myszy i 4,5 ml płynu Tyrode'a.

Z i n s s e r i współpracownicy (wg S a b i n a 1941 a) zmodyfikowali to podłoże zestalając je przy pomocy agaru.

Hodowlę na zarodkach kurzych stosuje się również w celu otrzymywania szczepionek przeciwko zakaźnej pleuropneumonii bydła.

WŁASNOŚCI BIOCHEMICZNE **oppp.**

Zdolność fermentowania badano u kilku zaledwie szczepów. W tabeli I uwidoczniono niektóre własności biochemiczne kilku szczepów **oppp.**

TABELA I

Własności fermentacyjne niektórych **oppp** (wg E d w a r d a 1954) — uproszczona

oppp	Hemoliza krwi końskiej	Fermentacja z wytworzeniem kwasu					
		skrobia	glukoza	fruktoza	galaktoza	maltoza	mannoza
Zarazek pleuropneumonii bydła	+	+	+	+	—	+	+
Zarazek L_3 z płuc szczurów	+	+	+	—	—	+	+
Zarazek L_4 wywołujący *arthritis* szczurów	+	×	—	—	—	—	+
Zarazek L_5 myszy	+	+	+	—	—	+	+
Mikroorganizmy z dróg rodnych bydła	+	×	—	—	—	—	×
Mikroorganizmy z dróg rodnych psów	b. słaba	×	—	×	×	×	×
Mikroorganizmy z dróg rodnych ludzkich	—	×	—	×	×	×	×
Mikroorganizmy z cewki moczowej człowieka	—	+	+	+	—	+	—
Mikroorganizmy ze śliny człowieka	—	×	—	×	×	×	×

Objaśnienia:

x — nie badano
\+ — wynik dodatni
— „ ujemny

Własności biochemiczne, obok morfologicznych, są podstawą podziału ludzkich szczepów **oppp.** F r e u n d t (1954) wyróżnia trzy grupy **oppp** pochodzenia ludzkiego.

Do grupy pierwszej zalicza organizmy nie fermentujące cukrów i słabo redukujące błękit metylenowy. Do drugiej — należą szczepy, które fermentują glukozę, laktozę, galaktozę, maltozę, glikogen, dekstrynę i skrobię i wolno redukują błękit metylenowy (w ciągu 3 — 10 godzin). Własności biochemiczne grupy trzeciej są podobne do cech drugiej z tym, że błękit metylenowy redukowany jest już w ciągu 30 minut.

WŁASNOŚCI SEROLOGICZNE.

Uodpornienie królików hodowlą **oppp** wywołuje powstawanie przeciwciał, których obecność można wykazać przy pomocy aglutynacji, precypitacji, wiązania dopełniacza i odczynu neutralizacji (S a b i n 1941 a, E d w a r d 1954).

S u c h a n o w a (1952) stwierdziła, że w surowicy królików i świnek morskich hyperimmunizowanych przy pomocy antygenów sporządzonych ze szczepów ludzkich **oppp** można wykazać obecność przeciwciał wiążących komplement. Nie stwierdziła natomiast obecności aglutynin i precypityn. Antygen powodował hemoaglutynację, która była wstrzymywana w obecności surowicy odpornościowej, a w mniejszym stopniu — surowicy normalnej.

E d w a r d i F i t z g e r a l d (wg E d w a r d a 1954) stwierdzili, że dodatek surowicy swoistej w znacznych rozcieńczeniach (1 : 1000) do podłoża stałego hamuje zupełnie wzrost homologicznych i pokrewnych serologicznie szczepów. Właściwość ta może mieć znaczenie praktyczne, gdyż pozwala dzielić **oppp** na grupy serologiczne przy użyciu nieznacznych ilości badanej zawiesiny.

Przy pomocy odczynu aglutynacji stwierdzono, że wszystkie szczepy bydlęcej pleuropneumonii tworzą jedną grupę serologiczną (wg S a b i n a 1941 a). Mikroorganizmy bezmleczności kóz są serologicznie odrębne.

S h o e t e n s a c k (wg E d w a r d a 1954) podzielił szczepy wyizolowane z psów na dwie grupy antygenowe. Zróżnicowano również szczepy mysie, szczurze i ludzkie.

D i e n e s i M a d o f f (1953) stwierdzili wyraźną różnicę we własnościach serologicznych między szczepami pochodzącymi z jamy ustnej, a szczepami z dróg rodnych ludzkich.

Mikroorganizmy pleuropneumoniopodobne wyizolowane ze ścieków przez L a i d l o w a i E l f o r d a (1936) podzielono na trzy grupy oznaczone literami *A*, *B*, i *C*. Szczepy *A* i *B* są serologicznie podobne, różnią się natomiast od szczepu *C*.

Mikroorganizmy Seifferta, jak wykazała K l i e n e b e r g e r (1940) mają własności antygenowe podobne do grupy *A* Laidlowa i Elforda.

Uodpornianie sztuczne prowadzi do powstawania łatwo wykazywalnych przeciwciał. Natomiast po przebyciu choroby często nie udaje się stwierdzić ich obecności. Nie wykryto np. przeciwciał neutralizujących u myszy i szczurów, które przeszły zakażenie **oppp** typu *A*, L_4 i zarazkiem szczurzego *polyarthritis* (wg S a b i n a 1941 a).

U bydła chorego na pleuropneumonię nie zawsze udaje się wykazać obecność aglutynin (S a b i n 1941 a). Występują natomiast w jego surowicy przeciwciała podobne do bakteriolizyn (E d w a r d 1954). Zdolność wytwarzania przeciwciał wykorzystano dla celów profilaktycznych w przypadku pleuropneumonii bydlęcej. Do uodporniania konieczne jest używanie żywych zawiesin. W tym celu atenuuje się szczepy przez wielokrotne pasażowanie przez podłoża sztuczne lub zarodki kurze (E d w a r d 1954). Metoda ta zawodzi przy zapobieganiu bez-

mleczności kóz, gdyż drobnoustroje te nawet po wielokrotnych pasażach nie tracą zjadliwości.

Do uodporniania z pomyślnym rezultatem zastosowano szczepy inaktywowane formaliną i adsorbowane na wodorotlenku glinu (wg Edwarda 1954).

WPŁYW CZYNNIKÓW CHEMICZNYCH I FIZYCZNYCH NA oppp.

Drobnoustroje pleuropneumoniopodobne są wrażliwe na działanie ciepła. Większość ginie w temperaturze 45° po 15 lub 30 minutach. Wyjątek stanowi szczep L_4, który po ogrzaniu do 56° przez 1 godzinę ulega jedynie atenuacji a ginie dopiero po poddaniu go temperaturze 60° przez okres 1 godziny (Sabin 1951 a).

Działanie niskich temperatur jest dla **oppp** nieszkodliwe. Można je również liofilizować i w tym stanie przechowywać przez okres kilku lat.

Obserwacje Kellera, Smitha i Mortona (1952) wykazały, że **oppp** są wrażliwe na działanie mydeł nawet w takim rozcieńczeniu, które nie hamuje wzrostu bakterii.

DZIAŁANIE ŚRODKÓW CHEMOTERAPEUTYCZNYCH.

Mikroorganizmy pleuropneumoniopodobne są zupełnie niewrażliwe na działanie penicyliny (Beveridge 1943, Brown 1949, Melen 1952, Poetschke 1952) oraz sulfonamidów (Beveridge 1943, Brown 1949, Melen 1952) zarówno *in vivo* jak i *in vitro*.

Własności hamujące wzrost wykazuje natomiast streptomycyna i chloromycetyna. Melen (1952) stwierdził, że 10 µg streptomycyny na 1 ml podłoża uniemożliwia rozwój ludzkich szczepów **oppp.** Streptomycyna działa również *in vivo* (Kane 1947). Chloromycetyna wstrzymuje wzrost *in vitro* już przy stężeniu 5 µg na 1 ml podłoża (Melen 1952). Przy zastosowaniu jej *in vivo* powoduje również zniknięcie **oppp** (wg Edwarda 1954).

Według doniesień Browna (1949), Durela (1951), Mincka (1952) i Tage (1954) silne działanie *in vivo* wywiera również aureomycyna.

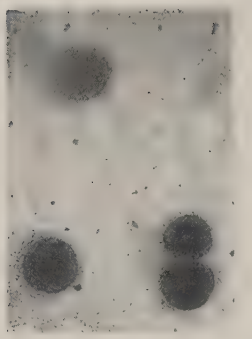
Oprócz antybiotyków, w leczeniu schorzeń wywoływanych przez **oppp** stosuje się również związki złota (Sabin 1941a, Edward 1954).

KLASYFIKACJA DROBNOUSTROJÓW GRUPY PLEUROPNEUMONII.

Mikroorganizmy pleuropneumonii zaliczane były do wirusów, promieniowców, bakterii właściwych. W miarę dokładniejszego poznawania ich morfologii i cyklu rozwojowego pojawiały się próby wydzielenia tej grupy drobnoustrojów w odrębną jednostkę systematyczną.

Turner (1935) umieszcza je w rzędzie *Borrelomycetales*, a Sabin (1941 b) w klasie *Paramycetes*.

Sabin (1941 a i b) pierwszy klasyfikuje drobnoustroje grupy pleuropneumonii. Proponuje on podział klasy *Paramycetes*, rząd *Anulomycetales* na dwie rodziny — *Anulomycetaceae* i *Sapromycetaceae*. Rodzina *Anulomycetaceae* obejmuje drobnoustroje zwierzęce, a *Sapromycetaceae* — szczepy Laidlowa i Elforda. Kryterium podziału są od-



Fot. 3. Mikrokolonia *L Proteus vulgaris* na agarze miękkim z surowicą i penicyliną. Powiększenie około 80 × (z nieopublikowanej pracy S a n d e r i T a b a c z y ń s k i)

mienne wymagania wzrostowe obu grup i czynnik ekologiczny (inne środowisko życia).

Dalszy podział rodziny *Anulomycetaceae* przeprowadza S a b i n w zależności od tego w jakim organiźmie występuje **oppp.** Klasyfikacja i nazwy jednostek systematycznych zaproponowane przez S a b i n a nie przyjęły się jednak w literaturze. Większość badaczy stosuje dziś własne oznaczenia literowe lub cyfrowe. I tak np. **oppp** wyizolowane z myszy dzieli się na szczepy: L_2, L_3, L_4, L_5, typy *A, B, C, D.* Podstawą tego podziału są odmienne własności serologiczne, morfologiczne i patogenne. Podobnie podział szczepów wyizolowanych z psów na typ *I* i *II* oparty jest na różnicach serologicznych i biologicznych. Ostatnio czynione są próby klasyfikowania szczepów ludzkich (N i c o l i E d w a r d 1953, F r e u n d t 1954).

STOSUNEK oppp DO TZW. FORM L BAKTERII.

W roku 1935 K l i e n e b e r g e r doniosła o występowaniu w kulturach *Streptobacillus moniliformis* symbiontycznych **oppp**. Oznaczyła je literą $\mathbf{L_1}$. Późniejsze badania wykazały, że podobne postacie powstają w hodowlach wielu gatunków bakterii pod wpływem penicyliny i niektórych innych substancji (D i e n e s i W e i n b e r g e r 1951). Dzięki obserwacjom D i e n e s a, W e i n b e r g e r a, F r e u n d t a i innych, poznana została istota tego zjawiska. Okazało się, że powstające na podłożu stałym postacie, określane jako tzw. formy **L** przypominające **oppp,** są fazą rozwojową bakterii. W roku 1945 K l i e n e b e r g e r zrezygnowała ze swojej teorii symbiozy i uznała pogląd innych badaczy na to zagadnienie.

Znaczne podobieństwo między mikrokoloniami **L** i **oppp** nie jest jednak kwestionowane. Dla łatwiejszego przeprowadzenia porównania form **L** i **oppp** podaję zespół charakterystycznych własności postaci **L** bakterii

Bakterie w fazie **L** rosną tylko na podłożach wzbogaconych. Najczęściej w tym celu używa się surowicy lub *ascites.* Na pożywkach stałych tworzą mikrokolonie, składające się w części centralnej z ziarnistości o średnicy od około 0,2 do 1 μ, w brzeżnych częściach kolonii znajdują się duże ciała, często zwakuolizowane, o średnicy około 10 μ (Fot. 3 Tabl.).

Postacie **L** bakterii rosną słabo na podłożach płynnych. W hodowlach bulionowych stwierdza się drobne ziarnistości, formy kuliste i pierścieniowate.

Bakterie w fazie **L** nie barwią się barwnikami anilinowymi, można je natomiast wykazać przy pomocy barwienia metodą Giemzy.

Według T u l a s n e (wg E d w a r d a 1954), D i e n e s a i W e i n b e r g e r a (1951) mikrokolonie **L** są nieodróżnialne morfologicznie od mikrokolonii **oppp.**

Odmienne stanowisko zajmuje Ø e r s k o v, F r e u n d t (1950, 1952) i E d w a r d (1954). Ich zdaniem formy **L** można łatwo odróżnić od **oppp.**

Ø e r s k o v i F r e u n d t zwracają uwagę na fakt, że w fazie **L** nie występują postacie nitkowate, jakoby charakterystyczne dla **oppp.**

Nowe obserwacje, a w tej liczbie również i Freundta (1954), wykazały jednak, że wiele szczepów **oppp** nie tworzy wyraźnych form nitkowatych.

Edward i Fitzgerald (1951), Edward (1954) zwracają uwagę na odmienne wymagania wzrostowe postaci **L** i **oppp** oraz na różnice w wyglądzie morfologicznym kolonii.

Zdaniem Edwarda (1954) mikrokolonie w fazie **L** są mniej przejrzyste niż u **oppp.** Mogą one też osiągać większe rozmiary niż mikrokolonie **oppp.**

Zasadniczą podstawą podziału na formy **L** i **oppp** nie mogą być jednak te nieznaczne, nie potwierdzone różnice w morfologii oraz nieco odmienne wymagania wzrostowe.

Jak wydawało się do niedawna najistotniejsza różnica polegała na tym, że postacie **L** powstają z bakterii pod wpływem działania różnych czynników np. penicyliny, niektórych aminokwasów, surowicy swoistej, i po przesianiu na świeżą pożywkę ulegają rewersji do postaci bakteryjnych, natomiast **oppp** są odrębną grupą mikroorganizmów.

Już jednak w 1951 roku Dienes, rozważając znaczne podobieństwo morfologiczne między fazą **L** a **oppp,** zwraca uwagę na prawdopodobieństwo hipotezy, według której **oppp** byłyby fazą **L** jakichś nieznanych bakterii. Teoretycznie można było przyjąć, że o ile formy **L** powstają *in vitro* pod wpływem różnych czynników niekorzystnych dla bakterii, to mogą one tworzyć się również *in vivo.*

Obserwacje Wittler (1952), nad przechodzeniem pałeczek krztuśca w uodpornionym organiźmie myszy w fazę **L,** potwierdziły to hipotetyczne założenie.

W ostatnich latach hipoteza o podobnej naturze form **L** i **oppp** zyskała poparcie eksperymentalne.

W roku 1952 Minck opisał obserwacje nad rewersją 5 szczepów **oppp,** wyizolowanych z kobiecych narządów rodnych, w bakterie podobne do maczugowców. Badał on własności serologiczne zarówno **oppp** jak i powstałych z nich bakterii i stwierdził, że są to formy antygenowo identyczne. Na tej podstawie Minck wysuwa przypuszczenie, że niektóre **oppp** nie są samodzielnymi organizmami, lecz fazą **L** bakterii.

Moustardier, Brisou i Perrey (1953), badając **oppp** wyizolowane z przypadków bezbakteryjnego zapalenia cewki moczowej, stwierdzili rewersję do postaci bakteryjnej czterech szczepów. W dwu przypadkach otrzymali *Streptococcus faecalis,* w jednym *Streptococcus faecalis alcaligenes* i *Proteus mirabilis.*

Kay i Taylor (1954) donoszą o przechodzeniu **oppp,** wywołujących u drobiu chroniczne schorzenie dróg oddechowych i zapalenie zatok u indyków, w pałeczki podobne do *Haemophilus gallinarum.* Zdaniem ich czynnikiem etiologicznym tej choroby są bakterie w fazie **L,** a nie, jak przypuszczano, **oppp.**

Opisane dotąd przypadki rewersji kilku szczepów **oppp** nie upoważniają do twierdzenia, że zawsze w razie wyosobnienia **oppp** mamy do czynienia z formami **L** jakichś bakterii. Dziś już jednak stwierdzić można, że przynajmniej niektóre **oppp** nie są odrębną grupą mikroorga-

nizmów. Natomiast fakt nieprzechodzenia większości szczepów **oppp** w postacie bakteryjne, mimo nawet wielokrotnych przesiewów, nie może być dowodem obalającym stającą się coraz bardziej prawdopodobną hipotezę, że wszystkie dotychczas opisywane **oppp** są formami **L** bakterii. Wiadomo bowiem, że bakterie w fazie **L** mają różny stopień „utrwalenia". Niektóre ulegają rewersji natychmiast po usunięciu czynnika powodującego przejście w postacie **L**, inne nawet po wielokrotnych pasażach nie dają form wyjściowych (D i e n e s 1951, M o u s t a r d i e r i współpracownicy 1953).

Tak więc **oppp** mogą być „utrwaloną" fazą **L** bakterii, która powstała w organiźmie zwierzęcym, ludzkim, w glebie, nawozie czy ściekach pod wpływem jakichś nieznanych nam dotąd czynników. W związku z zagadnieniem stosunku form **L** i **oppp** należy zwrócić uwagę na nieprzydatność przy izolacji **oppp** pożywek z dodatkiem substancji, które mogłyby już po wysianiu materiału wywołać przejście bakterii w fazę **L**.

Szczególnie nie wskazane jest dodawanie choćby najmniejszych stężeń penicyliny, gdyż mikrokolonie **L** powstają z niektórych wrażliwych bakterii już przy minimalnej zawartości penicyliny (0,5 jednostek międzynarodowych na 1 ml podłoża). O ile stosuje się już jednak pożywki wybiórcze z penicyliną, należy zawsze wykonywać posiewy kontrolne na podłoża bez penicyliny. (P o e t s c h k e 1952, F r e u n d t 1953).

II. METODY IZOLOWANIA I HODOWLI MIKROORGANIZMÓW GRUPY PLEUROPNEUMONII

Metody pobierania materiału podejrzanego o obecność **oppp** nie różnią się od powszechnie stosowanych w diagnostyce bakteriologicznej. Można więc do izolowania tych mikroorganizmów używać zarówno płynów ustrojowych jak i wymazów z różnych narządów.

W celu przekonania się czy w badanym materiale znajduje się mikroflora towarzysząca, wskazane jest sporządzenie przed wysiewem preparatów mazanych. Jak wiadomo, przy pomocy tej metody **oppp** nie udaje się wykazać.

DIAGNOZA OPPP NA PODŁOŻACH STAŁYCH

Posiew wykonuje się najczęściej na podłożach stałych. Jako pożywki podstawowej używa się 1,5 — 2,0% agaru odżywczego przyrządzonego na wyciągu z mięśnia serca wołu.

Stężenie jonów wodorowych zwykle nastawia się na pH — 7,8. Na tak przyrządzonym podłożu drobnoustroje z grupy pleuropneumonii rosną dopiero po wzbogaceniu go przez dodanie 20 — 30% surowicy lub *ascites*. O ile badany materiał zawiera bakterie, konieczne jest stosowanie pożywek wybiórczych. Jako substancje hamujące wzrost mikroflory bakteryjnej używany jest najczęściej teluryn potasu, fiolet krystaliczny, octan talu i penicylina.

S m i t h, M o r t o n i L e b e r m a n (1950) zalecają dodawanie do stałego podłoża fioletu krystalicznego w rozcieńczeniu 1 : 250 000 i telurynu potasu 1 : 50 000. Pierwsza z tych substancji wstrzymuje wzrost bakterii gramdodatnich, druga — gramujemnych.

Morton i Lecce (1953) zwracają uwagę, na hamowanie rozwoju niektórych szczepów **oppp** w przypadku stosowania fioletu krystalicznego. Według ich obserwacji korzystniejsze jest zastąpienie fioletu i telurynu potasu octanem talu w rozcieńczeniu 1 : 5000. Octan talu w tej koncentracji wstrzymuje wzrost bakterii gramdodatnich i większości gramujemnych.

Freundt (1953) zaleca dodawanie penicyliny w ilości 2 jednostek międzynarodowych na 1 ml podłoża i octanu talu w rozcieńczeniu 1 : 2 000.

Poetschke (1952) donosi o wyizolowaniu **oppp** z ludzkich dróg rodnych na podłożach zawierających penicylinę jako substancję hamującą wzrost bakterii gramdodatnich, a nie działającą na **oppp.**

Wzrost **oppp** na podłożach stałych pojawia się po dwu do trzech dniach inkubacji w 37°. W przypadku hodowli szczepów glebowych i ściekowych można stosować temperaturę 22°. Organizmy pleuropneumoniopodobne rosną zarówno w warunkach tlenowych, mikroaerofilnych jak i przy zwiększonym ciśnieniu parcjalnym CO_2.

W przypadku obecności **oppp** w badanym materiale, na powierzchni podłoża pojawiają się, najwcześniej po 48 godzinach, charakterystyczne mikrokolonie. Obserwacje przeprowadzać można bezpośrednio na pożywce przy pomocy małych lub średnich powiększeń mikroskopu.

Dienes (1945) opisuje metodę barwienia mikrokolonii bez uprzedniego utrwalania. W tym celu na powierzchnię agaru, w miejscach w których stwierdzono obecność mikrokolonii, kładzie się szkiełka nakrywkowe z wyparowanym alkoholowym roztworem błękitu metylenowego i azuru. Barwik dyfundując do podłoża zabarwia kolonie. Sporządzanie preparatów mazanych nie daje zwykle rezultatów, gdyż szybkie wysychanie **oppp** powoduje ich niszczenie.

Duże znaczenie w badaniu morfologii kolonii **oppp** mają preparaty odciskowe. Umożliwiają one obserwację barwionych odcisków mikrokolonii przy użyciu obiektywu immersyjnego. Przy sporządzaniu preparatów odciskowych, najczęściej stosuje się metodę Kuhna (1931), Klieneberger (1935) lub Dienesa (1945).

Metoda Kuhna:

Do badania **oppp** metodę tę zastosowała po raz pierwszy Klieneberger w roku 1953. Wcześniej służyła ona Kuhnowi i Sternberg (1931) przy obserwowaniu tzw. Pettenkoferii.

Do utrwalania i barwienia potrzebne są następujące roztwory:

1. Nasycony wodny roztwór sublimatu
2. „Kwas dwuchromooctowy" (100 ml wody destylowanej + 3 g dwuchromianu potasu + 5 ml kwasu octowego lodowatego).
3. 70, 50, 25, 15% roztwory alkoholu etylowego.
4. 5% tiosiarczan sodu.
5. barwik Giemzy (9 kropli roztworu barwika Giemzy na 15 ml obojętnej wody destylowanej).
6. ksylol, aceton.

Technika utrwalania.

1. Wyciąć kwadrat agaru nieco mniejszy od szkiełka nakrywkowego.
2. Na powierzchnię kwadratu, nałożyć jałowe szkiełko nakrywkowe.
3. Umieścić kostkę agarową ze szkiełkiem na dwu cienkich bagietkach szklanych w szkiełku zegarkowym, tak by agar znajdował się między nakrywającym go szkiełkiem a bagietkami.
4. Napełnić szkiełko zegarkowe gorącym roztworem sublimatu. Kostka agaru i szkiełko muszą być pokryte płynem.
5. Ściągnąć sublimat.
6. Napełnić szkiełko zegarkowe „kwasem dwuchromooctowym".
7. Po 15 minutach odciągnąć roztwór dwuchromianu potasu i kwasu octowego.
8. Zalać kostkę agaru — kolejno: 70%, 50% i 25% roztworem alkoholu. Proces ten powinien trwać 20 minut.
9. Po ściągnięciu alkoholu, umieścić bloczek agarowy ze szkiełkiem w komorze wilgotnej na okres 10 minut.
10. Zdjąć szkiełko z agaru.
11. Spłukać je 15% roztworem alkoholu, aż do odbarwienia.
12. Spłukać szkiełko 5% tiosiarczanem sodu.
13. Barwić roztworem barwika Giemzy przez 16 — 18 godzin.
14. Spłukać szkiełko wodą destylowaną.
15. Różnicować w ksylolu i acetonie.
16. Umieścić szkiełko nakrywkowe na podstawowym i zatopić w balsamie kanadyjskim.

Metoda Klieneberger.

Jako utrwalacza Klieneberger używa roztworu Bouin (15 ml nasyconego wodnego roztworu kwasu pikrynowego + 5 ml formaliny + 1 ml kwasu octowego lodowatego — składniki te należy mieszać bezpośrednio przed użyciem) lub Flemminga (kwas osmowy 0,1% + kwas chromowy 0,2% + kwas octowy lodowaty 0,1% — kwas octowy należy dodawać bezpośrednio przed użyciem).

Technika utrwalania:

1. Wyciąć kostkę agaru i umieścić ją na szkiełku nakrywkowym powierzchnią wzrostu do szkiełka.
2. Na agar wkraplać jeden z roztworów utrwalających. Roztworem Bouin działać 30 minut, Flemminga — 60 minut.
3. Po utrwaleniu — na kostkę agaru nałożyć bibułę na okres 30 minut.
4. Kostkę agaru wraz ze szkiełkiem umieścić na 12 godzin w wilgotnej komorze.
5. Zdjąć agar.
6. Płukać szkiełko w wodzie przez 2 godziny, zmieniając wodę trzy razy.
7. Barwić barwikiem Giemzy (1 kropla roztworu barwika na 1 ml mieszaniny wody destylowanej i gotowanej w równej ilości) przez 12 godzin.
8. Płukać szkiełko wodą wodociągową, a potem destylowaną.

Metoda Dienesa.

Dla sporządzenia preparatów odciskowych metodą opisaną przez Dienesa, konieczne są następujące roztwory:

1) utrwalacz Bouin. Zenkera względnie mieszanina kwasu fosforowego i formaliny.

2) Roztwór safraniny i fioletu metylenowego.

3) Roztwór zapobiegający deformacji mikroorganizmów w czasie utrwalania. W skład jego wchodzi: 0,4% NaCl, 0,1% KH_2PO_4, 5% glukozy z dodatkiem *ascites* w ilości 1/20 objętości roztworu.

4) Roztwór złożony z *ascites*, wody i glukozy w stosunku 1 : 7 : 5.

Technika sporządzania preparatów:

1. Po wysianiu badanego materiału na podłoże stałe wyciąć kostki agaru i umieścić je na szkiełkach nakrywkowych, tak by powierzchnia, na której dokonano posiewu, przylegała do szkiełka.

2. Kostki agaru ze szkiełkami położyć w naczyńkach z roztworem złożonym z NaCl, KH_2PO_4, glukozy i *ascites*, tak by tylko górna powierzchnia kostki nie była pokryta płynem.

3. Naczyńka umieścić w termostacie na okres 48 — 72 godzin.

4. Utrwalać jednym z podanych utrwalaczy.

5. Zdjąć agar ze szkiełka.

6. Barwić.

7. Bezpośrednio po zabarwieniu, zalać szkiełka płynem złożonym z *ascites*, glukozy i wody. Roztwór ten zapobiega zniekształceniu struktury kolonii i jej elementów przy wysychaniu preparatu.

Sporządzenie preparatów odciskowych z hodowli na podłożu stałym nie jest konieczne dla diagnozy **oppp.** Wystarczą bowiem obserwacje bezpośrednie mikrokolonii nieutrwalanych i niebarwionych. Wskazane jest natomiast pasażowanie mikrokolonii zarówno na podłożach stałych jak i na płynnnych. Szczególnie ważne jest to przy używaniu do izolacji pożywek z dodatkiem penicyliny. Otrzymanie typowego wzrostu po przesianiu na agar z surowicą i na bulion z surowicą, w znacznej mierze wyklucza możliwość pomylenia **oppp** z formami **L,** które mogą powstawać na podłożu nawet pod wpływem minimalnych stężeń penicyliny. W celu wykonania przesiewu na agar, wycina się kostkę podłoża, na której znajdują się mikrokolonie **oppp,** i przesuwa ją po czystej pożywce. Na linii przesunięcia pojawiają się po 24 do 48 godzinach liczne charakterystyczne kolonie. Przy pasażowaniu na pożywkę płynną — należy spłukać wzrost z czystej hodowli **oppp** na podłożu stałym i zawiesinę zasiać na bulion z surowicą.

DIAGNOZA OPPP NA PODŁOŻACH PŁYNNYCH

Podłoża płynne są rzadko stosowane dla izolowania **oppp** z badanego materiału. Według doniesień S a b i n a (1942) i D i e n e s a (1945) wiele szczepów, a zwłaszcza przy pierwszym wysiewie, rośnie na nich bardzo powoli.

M o r t o n, S m i t h i L e b e r m a n (1951 a) stosują bulion z surowicą dla otrzymania wzrostu **oppp** z organizmu ludzkiego. Jako substancji hamującej rozwój towarzyszącej mikroflory używają fioletu krystalicznego 1 : 100 000 i telurynu potasu — 1 : 35 000. Po dwóch dniach inkubacji w 37° zawiesinę bulionową przenoszą na podłoże stałe.

F r e u n d t (1953) uzyskiwał dobre rezultaty wysiewając badany materiał na bulion z surowicą i z dodatkiem takiej ilości agaru, by podłoże było półpłynne. Również i w tym przypadku już po kilku godzinach stosował przesiew na 1,5% agar z surowicą. Diagnoza **oppp** na pożywce płynnej opiera się na wykonaniu preparatów utrwalanych i barwionych metodą Grama, oraz wilgotnych preparatów barwionych barwikiem Giemzy. W przypadku otrzymania hodowli **oppp** w preparacie utrwalonym i barwionym metodą Grama nie stwierdza się obecności żadnych upostaciowanych elementów. Natomiast w preparacie wilgotnym, barwionym metodą Giemzy, widoczne są postacie kuliste, pierścieniowate, ziarniste i ewentualnie nitkowate.

Hodowle bulionowe można badać również przy użyciu ciemnego pola widzenia. Wzrostowi **oppp** towarzyszy często nieznaczne zmętnienie pożywki. Po dłuższym czasie powstaje na powierzchni bulionu słaby kożuszek.

BADANIE WŁASNOŚCI BIOCHEMICZNYCH.

Zdolność fermentowania cukrów badana jest na podłożach stałych z dodatkiem 1% węglowodanu i 0,005% czerwieni fenolowej. Kroplę wskaźnika można również umieszczać przy pomocy pipety pasteurowskiej już po inkubacji w miejscu, w którym stwierdzono mikroskopowo wzrost **oppp.**

Własności hemolityczne obserwuje się na podłożach płynnych. W tym celu do 1 ml hodowli bulionowej dodaje się 5% zawiesiny krwinek końskich i mieszaninę inkubuje w 37°.

Otrzymywanie zawiesiny do badania własności serologicznych.

Zawiesinę do uodporniania zwierząt i do wykonywania odczynów serologicznych uzyskuje się przez wirowanie hodowli bulionowej przy wysokiej ilości obrotów przez 1 godzinę.

III. WYSTĘPOWANIE DROBNOUSTROJÓW GRUPY PLEUROPNEUMONII W ORGANIZMACH ZWIERZĘCYCH I LUDZKICH.

SZCZEPY BYDLĘCE oppp.

M i k r o o r g a n i z m y w y w o ł u j ą c e z a k a ź n ą p l e u r o p n e u m o n i ę b y d ł a.

Pleuropneumonia jest silnie zakaźną chorobą bydła, charakteryzującą się wysiękowym zapaleniem międzypłatowych naczyń limfatycznych i pęcherzyków płucnych z jednoczesnym wysiękowo-włóknikowym zapaleniem opłucnej.

Choroba przenosi się prawdopodobnie drogą kropelkową. Można ją wywoływać sztucznie przez szczepienie bydła limfą chorych zwierząt, hodowlą bulionową mikroorganizmów pleuropneumonii lub jej filtratem.

Mikroorganizmy bydlęcej pleuropneumonii stanowią jednolitą grupę serologiczną. Rozwijają się słabo na agarze z surowicą króliczą, dobrze na podłożach stałych z surowicą końską. Wzrost następuje zarówno w warunkach tlenowych jak i mikroaerofilnych. Optimum temperatury wynosi 37°, poniżej 30° — nie rosną.

Szczepy *P* — wyizolowane zostały z dróg rodnych bydła (Edward 1950).

Szczepy *S* — wyizolowane zostały również z dróg rodnych bydła (Edward 1950); różnią się tym od poprzednich, że nie wymagają do wzrostu surowicy lub *ascites*. Prawdopodobnie nie są stałymi mieszkańcami narządów rodnych bydła a dostają się tam z gleby lub ściółki.

SZCZEPY ZAKAŹNEJ BEZMLECZNOŚCI KÓZ I OWIEC.

Zmiany chorobowe umiejscowiają się w stawach (*arthritis*), rogówce (*keratitis*) a u samic w okresie laktacji w gruczołach mlecznych (*mastitis*).

Morfologicznie i biochemicznie, mikroorganizmy bezmleczności kóz i owiec podobne są do szczepów bydlęcych. Serologicznie stanowią grupę odrębną.

ORGANIZMY WYIZOLOWANE Z PSÓW.

U psów stwierdzono obecność **oppp** w tkankach i wydzielinie nosowej w przypadku nosówki. Prawdopodobnie mogą one wywoływać zmiany chorobowe towarzyszące objawom wirusowej nosówki. Organizmy pleuropneumoniopodobne występują również w pochwie, nasieniu, jamie ustnej u psów.

Edward i Fitzgerald (1951) dzielą szczepy wyizolowane z dróg rodnych i gardła psów na trzy grupy oznaczone literami: α, β, γ. Różnią się one między sobą wyglądem kolonii, wymaganiami wzrostowymi i własnościami biochemicznymi.

ORGANIZMY WYIZOLOWANE ZE SZCZURÓW.

Organizmy L_3. Wyosobniane są często z płuc szczurów, wywołują u nich prawdopodobnie bronchopneumonię (wg Sabina 1941 a).

Organizmy L_4. — Antygenowo odmienne od L_3. Po raz pierwszy wyizolowane zostały przez Klieneberger (wg Edwarda 1954) z gruczołów podszczękowych szczurów, a następnie przez Preston a (1942) ze stawów osobników chorych na *polyarthritis*. Szczepy te są prawdopodobnie identyczne z otrzymanymi przez Colliera w 1938 (wg Beeuwekes i Collier, 1942) z przypadków *arthritis* u *Rattus norvegicus*.

Organizmy pleuropneumoniopodobne wyhodował ze stawów szczurów również Toward (wg Beeuwekes i Collier, 1942).

Filtraty hodowli przez sączki Seitza EK i Chamberlanda L_3 wywoływały u szczurów zapalenie stawów.

ORGANIZMY PLEUROPNEUMONIOPODOBNE POCHODZĄCE Z MYSZY.

Organizmy te izolowane były z nosa, worka spojówkowego, dróg oddechowych i mózgu myszy. W przypadkach chorobowych stwierdzano je w chronicznym zakażeniu dróg oddechowych, zapaleniu ucha środkowego, zapaleniu płuc i zapaleniu spojówki (wg Sabina 1941 a, Edwarda 1954).

Tu należą między innymi szczepy L_5 wyizolowane z mózgu oraz L_6 wyhodowane z krwi myszy.

Szczepy pochodzące z myszy nie tworzą serologicznie jednolitej grupy (wg E d w a r d a 1954).

SZCZEPY POCHODZĄCE Z ORGANIZMU LUDZKIEGO.

Znaczną ilość prac dotyczącą ludzkich szczepów **oppp** poświęcono występowaniu i ich ewentualnej roli w schorzeniach narządów rodnych.

K l i e n e b e r g e r (1945) stwierdziła, że w pochwie ginekologicznie zdrowych kobiet **oppp** występują bardzo rzadko. Często natomiast można je wyizolować z dróg rodnych przy różnych procesach zapalnych.

D i e n e s i współpracownicy (1948) otrzymali czyste hodowle **oppp** z 6-ciu przypadków na 58 ostrego względnie chronicznego *vaginitis* i *cervicitis*. Należy przypuszczać, że **oppp** były tu czynnikiem etiologicznym.

M e l e n i O d e b l a d (1952) potwierdzają poprzednie doniesienia o występowaniu **oppp** w sprawach zapalnych dróg rodnych. U czterdziestu pacjentek z *vaginitis* na 47 badanych wykazali obecność **oppp.** Z 6-ciu przypadków *salpingitis* — wszystkie dały wynik dodatni. Mikroorganizmy pleuropneumoniopodobne stwierdzili oni poza tym w drogach rodnych kobiet chorych na *cervicitis* i *endometritis*.

F r e u n d t (1953) badał wymazy z szyjki, pochwy i cewki moczowej. Otrzymał on następujące wyniki:

rozpoznanie	% **oppp**
1. schorzenia ginekologiczne o charakterze zapalnym (*salpingitis, parametritis, endometritis, cervicitis, vaginitis, erosio oophoritis*)	62 %
2. schorzenia ginekologiczne niezapalne (*prolapsus uteri, dysmenorrhea*)	37,1 %
3. normalna ciąża	27,1 %
4. inne schorzenia	34,3 %

F r e u n d t (1953) stwierdził, że **oppp** nie występują przy normalnej mikroflorze pochwy. Często natomiast towarzyszą *Trichomonas vaginalis*.

G o t t h a r d s o n i M e l e n (1953) otrzymali czystą hodowlę **oppp** z dwu przypadków *salpingitis* na 5 badanych. Autorzy nadmieniają, że jedna z pacjentek leczona była penicyliną. Istnieje więc prawdopodobieństwo, że wyizolowane mikrokolonie były formami **L** bakterii, które powstały w organiźmie.

R a n d a l l i współpracownicy (wg M o r t o n a, S m i t h a i K e l l e r a 1952) zwrócili uwagę na wpływ leczenia penicyliną na zwiększenie ilości otrzymywanych dodatnich wyników badania w kierunku **oppp.** Penicylina spełnia w tym przypadku rolę czynnika niszczącego towarzyszącą mikroflorę i w ten sposób ułatwia izolację **oppp.** Prawdopodobnie powoduje również przejście niektórych bakterii w formy **L,** nieodróżnialne morfologiczne od **oppp.**

Mniej liczne są prace dotyczące roli **oppp** w schorzeniach dróg rodnych męskich.

Dienes i Smith (1946) donoszą o otrzymaniu czystych hodowli **oppp** u kilku pacjentów z *prostatitis*. W innych przypadkach wyizolowali oni **oppp** obok innych mikroorganizmów.

Dienes i współpracownicy (1948) oraz Mc Lachian (1951) zwracają uwagę na częste występowanie **oppp** w przypadku tzw. zespołu Reitera (*urethritis — arthritis — conjunctivitis*).

Dienes (1948) otrzymał czystą hodowlę **oppp** w jednym przypadku tego schorzenia ze stawów. Częściej natomiast izoluje się je z cewki moczowej. Duży procent przypadków choroby Reitera z dodatnimi wynikami na obecność **oppp** i znikanie tych mikroorganizmów po leczeniu nasuwa przypuszczenie, że czynnikiem etiologicznym w tym schorzeniu mogą być **oppp.**

Hodowle **oppp** otrzymano również z przypadków *urethritis — prostatitis — cystitis, urethritis — prostatitis — cystitis — arthritis* (Melen 1952, Kane i Foley 1947).

Dużo obserwacji poświęcono również występowaniu i roli **oppp** w bezbakteryjnym zapaleniu cewki moczowej (Kane i Foley 1947, Melèn 1948, Wagner i współpracownicy 1953, Tage Jensen 1954).

Jakkolwiek **oppp** izolowano dość często z przypadków niespecyficznego zapalenia cewki moczowej, to jednak rola ich w tym schorzeniu jest niepewna.

Wagner i współpracownicy (1953), Nicol i Edward (1953) stoją na stanowisku, że bezbakteryjne zapalenie cewki moczowej nie jest wywoływane przez **oppp.** Zwracają oni uwagę na to, że **oppp** nie są wyizolowywane w czystych kulturach, lecz towarzyszy im obfita flora bakteryjna.

Ruiter i Wentholt (wg Nicola i Edwarda, 1953) wykonali doświadczenie ze sztucznym zakażeniem dwu mężczyzn szczepami **oppp** wyhodowanymi z przypadku *urethritis*. Wynik był ujemny.

Poza drogami rodnymi i moczowymi **oppp** występują często w jamie ustnej.

Morton i współpracownicy (1951 a) stwierdzili obecność **oppp** u 51 osób na 110 przebadanych. Hodowle **oppp** z jamy ustnej ludzi zdrowych otrzymali również Dienes i Madoff (1953).

Obecność **oppp** w innych narządach ludzkich stwierdzono tylko sporadycznie.

Pain i współpracownicy (1950) stwierdzili obecność **oppp** w przypadku ropnia mózgu i *meningitis* po mechanicznym uszkodzeniu oka.

Z płynu mózgo-rdzeniowego wyhodowano hemolityczne paciorkowce i **oppp.** Rola etiologiczna **oppp** jest więc tu zupełnie niepewna. Można przypuszczać, że **oppp** dostały się do mózgu ze spojówek, na których często znajdują się.

Carlson i współpracownicy (1951) otrzymali czystą hodowlę **oppp** z płynu mózgo-rdzeniowego pacjenta, u którego stwierdzono ro-

pień mózgu, a następnie *meningitis*. Po śmierci pacjenta wyizolowano **oppp** również i z mózgu. Mikroflory bakteryjnej nie stwierdzono ani w płynie mózgo-rdzeniowym, ani w tkance mózgowej.

Płyn mózgo-rdzeniowy zaszczepiony dootrzewnowo myszom nie wywołał u nich żadnego schorzenia. Z wysięku powstałego w jamie otrzewnowej otrzymano czystą hodowlę **oppp.**

Carlson i współpracownicy (1951) wyizolowali również **oppp** z krwi pacjentów, u których stwierdzono schorzenie Henocha — Schönleina. Trudno jednak wnioskować o roli **oppp** w tej chorobie.

Poczyniono również próby izolowania **oppp** ze stawów w przypadkach *arthritis*. Występowanie tych mikroorganizmów w płynie stawowym szczurów chorych na zapalenie stawów nasunęło przypuszczenie, że i u ludzi choroba ta może mieć podobną etiologię. Czystą hodowlę **oppp** ze stawów udało się uzyskać Dienesowi i współpracownikom (1948) oraz Brownowi i współpracownikom (wg Mortona, Smitha i Kellera, 1952). Negatywne wyniki uzyskał Preston (1942). A więc rola **oppp** i w tej chorobie nie jest jasna.

Brak większej ilości prac dotyczących występowania **oppp** w organizmie ludzkim uniemożliwia wyciągnięcie ostatecznych wniosków co do znaczenia tych mikroorganizmów w schorzeniach o nieznanej lub niepewnej etiologii.

Już jednak na podstawie dotychczasowych obserwacji, wydaje się, że **oppp** mogą w pewnych warunkach wywoływać lokalne sprawy zapalne, zwłaszcza w narządach rodnych kobiet.

LITERATURA

1. Beeuwekes H., Collier A., 1942: Studies on arthrotropic pleuropneumonia-like organisms., *J. Infect. Dis.*, **70** : 1.
2. Beveridge W. J. B., 1943: Isolation of pleuropneumonia-like organisms from male urethra., *Med. J. Aust.*, **2** : 479.
3. Beveridge W. J. B., 1946: Pleuropneumonia-like organisms in case of nongonococcal urethritis in man and in normal female genitalia., *Med. J. Aust.*, **1** : 179.
4. Brown T. P., Wechelhausen R. H., Robinson L. B., Merchant W. R., 1949: The in vivo action of aureomycin on pleuropneumonia-like organisms associated with various rheumatic diseases., *J. Lab. clinic. Med.*, **34** : 1404.
5. Carlson J. H., Spector S., Douglas H. G., 1951: Possible role of pleuropneumonia group of organisms in etiology of diseases of childhood., *Amer. J. Dis. Child.*, **81** : 193.
6. Dienes L., 1945: Morphology and nature of pleuropneumonia group of organism., *J. Bact.*, **50** : 441.
7. Dienes L., 1953: Electron micrographs made from *L* forms of *Proteus* and two human strains of pleuropneumonia-like organisms., *J. Bact.*, **66** : 280.
8. Dienes L., Smith W. E., 1946: Studies on the incidence and pathogenicity of pleuropneumonia-like organisms., *J. Clinic Investigation*, **25** : 911.
9. Dienes L., Ropes M. W., Smith W. E., Madoff S., Bauer W., 1948: The role of pleuropneumonia-like organisms in genito- urinary and joint diseases. *New Engl. J. Med.*, **238** : 509.

10. Dienes L., Weinberger H. J., 1951: The *L* forms of bacteria, *Bact. Rev.*, **15** : 245.
11. Dienes L., Madoff S., 1953: Differences between oral and genital strains of human pleuropneumonia-like organisms., *Proc. Soc. exp. Biol.*, **82** : 36.
12. Durel P., Roiron-Ratner V., Borell H., 1951: Role of L organisms in the veneral rheumatism., *Pr. med.*, **59** : 789.
13. Edward D. G., 1947: A selective medium for pleuropneumonia-like organisms., *J. gen. Microbiol.*, **1** : 238.
14. Edward D. G., 1950: An investigation of pleuropneumonia-like organisms isolated from bovine genital tract., *J. gen. Microbiol.*, **4** : 4.
15. Edward D. G., 1952: The pleuropneumonia group of organisms and their significance in genital infection., *Brit. J. Vener. Dis.*, **28** : 89.
16. Edward D. G., 1954: The pleuropneumonia group of organisms: a review together with some new observations., *J. gen. Microbiol.*, **10** : 27.
17. Edward D. G., Fitzgerald W. A., 1951 a: The isolation of organisms of pleuropneumonia group from dogs., *J. gen. Microbiol.*, **5** : 566.
18. Edward D. G., Fitzgerald W. A., 1951 b: Cholesterol in the growth of organisms of pleuropneumonia group., *J. gen. Microbiol.*, **5** : 576.
19. Freundt E. A., 1950: Observations on Dienes *L* type growth of bacteria., *Acta pathol. microbiol. Scand.*, **27** : 159.
20. Freundt E. A., 1952: Morphological studies of the pleuropneumonia organisms, *Acta pathol. microbiol. Scand.*, **31** : 508.
21. Freundt E. A., 1953: The occurence of micromyces in the female genitourinary tract. Relation to the pH and general flora of vagina., *Acta pathol. microbiol. Scand.*, **32** : 468.
22. Freundt E. A., 1954: Morphological and biochemical investigations of human pleuropneumonia-like organisms, *Acta pathol. microbiol. Scand.*, **34** : 127.
23. Gotthardson A., Melen B., 1953: Isolation of pleuropneumonia-like organisms from ovarian abscesses, *Acta pathol. microbiol. Scand.*, **33** : 291.
24. Harkness A. H., Henderson-Begg A., 1948: The significance of pleuropneumonia-like organisms or „*L*" organisms in non-gonococcal urethritis, Reiter's disease and abacterial pyuria., *Brit. J. Vener. Dis.*, **24** : 50.
25. Kane L., Foley G. D., 1947: Streptomycin therapy in 52 cases of bacterial infections, *New. Engl. J. Med.*, **237** : 531.
26. Kay Mc K. A., Taylor J. R. F., 1954: The reversion of *L* type cultures previously described as pleuropneumonia-like and associated with chronic respiratory disease to an organism resembling *Hemophilus gallinarum.*, *Canad. J. Comp. Med.*, **18** : 7 (wg *Excerpta Medica, Microbiol.*, 1954, 7).
27. Keller R., Smith P. F., Morton H. E., 1952: Susceptibility of pleuropneumonia-like organisms from human genital tract to the action of soaps, *J. gen. Microbiol.*, **7** : 313.
28. Klieneberger E., 1935: The colonial development of organisms of pleuropneumonia and agalactia in serum agar and variations of the morphology under different conditions of growth., *J. Path. Bact.*, **39** : 409.
29. Klieneberger E., 1945: Pleuropneumonia-like organisms in the human vagina, *Lancet* **2** : 46.
30. Kuhn P., Sternberg K., 1931: Ueber Bakterien and Pettenoferien, *Zbl. Bact., I, Orig.*, **121** : 113.

31. Lachian Mc A. E. W., 1951.: Reiter's syndrome, *Bristol med. chir. J.*, **66** : 87.

32. Laidlow P. P., Elford W. J., 1936:A new group of filtrable organisms, *Proc. Roy. Soc. B.*, **120** : 292.

33. Lecce J. G., Morton H., 1954: Metabolic studies on three strains of pleuropneumonia-like organisms isolated from man., *J. Bact.*, **67** : 62.

34. Melén B., Odeblad E., 1952: Pleuropneumonia-like organisms in the genito- urinary tract of healthy women, *Acta derm.-venereol. Stockh.*, **32** : 74.

35. Melén B., B. Linnross: 1952: Pleuropneumonia-like organisms in cases of non gonococcal urethritis in man, *Acta derm.-venereol. Stockh.*, **32** : 77.

36. Minck R., 1952: Investigation on the origin of organisms of peripneumonia type found in the female genital organs., *C. R. Acad. Sci.*, (wg *Excerpta Medica, Microbiol.*, 1953, 6).

37. Minck R., Gander R., 1952: Peripneumonia type organisms in the female genital apparatus, *Bull. Fed. Soc. Gynec. et Obstet.*, **4** : 983.

38. Morton H. E., Smith P. F., Williams N. B., Eickenberg C. F., 1951 a: Isolation of pleuropneumonia-like organisms from human saliva: a newly detected member of the oral flora, *J. Dent. Res.*, **30** : 415.

39. Morton H. E., Smith P. E., Leberman P. R., 1951 b: The cultivation of pleuropneumonia-like organisms from the human genitourinary tract with reference to their possible veneral transmission, *Am. J. Syph.*, **35** : 14.

40. Morton H. E., Smith P. E., Leberman P. R., 1951 c: Investigation of the cultivation of pleuropneumonia-like organisms from man, *Am. J. Syph. Gonor.* **35** : 361.

41. Morton H. E., Smith P. E., Keller R., 1952: Prevalence of pleuropneumonia-like organisms and the evaluation of media and methods for their isolation from clinical material, *Am. J. Publ. Health*, **42** : 913.

42. Morton H. E., Lecce J. G., 1953: Selective action of thallium acetate and crystal violet for pleuropneumonia-like organisms of human origin, *J. Bact.*, **66** : 646.

43. Moustardier G., Brisou J., Perrey H., 1953: Milieu de culture pour l'isolement des organisms *L* dans les uréthrites amicrobiennes a inclusions, *Ann. Inst. Pasteur*, **85** : 515.

44. Moustardier G., Brisou J., Perrey H., 1953: Transformation en bactéries normales d'organismes L isolés per culture à partir d'uréthrites amicrobiennes à inclusions, *Ann. Inst. Pasteur*, **85** : 520.

45. Nicol C. S., Edward D. G., 1953: Role of organisms of the pleuropneumonia group in human genital infections, *Brit. J. Vener. Dis.*, **24** : 141.

46. Nowak J., 1929: Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la péripneumonie des bovides, *Ann. Inst. Pasteur*, **43** : 1330.

47. Paine E., Murray R., Perlmutter I., Finland M., 1950: Brain abscess and meningitis associated with a pleuropneumonia-like organisms: Clinical and bacteriological observations in a case with recovery, *Ann. intern. Med.*, **32** : 554.

48. Poetschke G., 1952: Untersuchungen zur Pleuropneumonie-gruppe und ihrem Vorkommen bei Menschen, *Zbl. Bakt., I, Orig.*, **158** : 3.

49. Preston W. S., 1942: Arthritis in rats caused by pleuropneumonia-like organisms and the relationship of similar organisms to the human rheumatisms, *J. Infect. Dis.*, **70** : 180.
50. Salaman M. H., King A. J., 1946: The isolation of pleuropneumonia from genital tract of men and women, *J. Path. Bact.*, **58** : 31.
51. Sabin A. B., 1941 a: The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group, *Bact. Rev.*, **5** : 1.
52. Sabin A. B., 1941 b: The filtrable micro-organisms of the pleuropneumonia group (Appendix on classification and nomenclature), *Bact. Rev.*, **5** : 331.
53. Seiffert G., 1937 a: Filtrable Mikroorganismen in der freien Natur, *Zbl. Bakt., I, Orig.*, **140** : 168.
54. Seiffert G., 1937 b: Über das Vorkommen filtrabler Mikroorganismen in der Natur und ihre Züchtbarkeit, *Zbl. Bakt., I, Orig.*, **139** : 337.
55. Smith P. F., Morton H. E., 1951: The separation and characterization of the growth factor in serum and ascitic fluid which is required by certain pleuropneumonia-like organisms, *J. Bact.*, **61** : 395.
56. Smith P. F., Morton H. E., Leberman P. R., 1950: Susceptibilities of pleuropneumonia-like organisms to some selective bacteriostatic agents. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **74** : 525.
57. Swift H. F., Brown T. Mc. P., 1939: Pathogenic pleuropneumonia-like organisms from acute rheumatic exudates and tissues, *Science*, **89** : 271.
58. Tage Jensen 1954: Non-gonococcal urethritis treated with aureomycin, *Acta Dermato-Venerologica*, **34** : 82.
59. Turner A. W,. 1935: Pleuropneumonia contagiose boum, *J. Path. Bact.*, **41** : 1.
60. Wagner B. M., Morse W. H., Kuhn D. M., 1953: Recent studies on nonspecific urethritis, *Am. J. publ. Health*, **43** : 853.
61. Weiss L. J., 1944: Electron micrographs of pleuropneumonia-like organisms, *J. Bact.*, **47** : 523.
62. Wittler R., 1952: The L forms of *Hemophilus pertussis* in the mouse, *J. gen. Microbiol.*, **6** : 311.
63. Wróblewski W., 1931: Morfologia mikroba zarazy płucnej bydła, *Medyc. Dośw. i Społeczna*, **13** : 155.
64. Wróblewski W., 1933: Morfologia mikroba zarazy płucnej bydła w płynie wysiękowym płuc chorych zwierząt, *Medyc. Dośw. i Społeczna*, **17** : 382.
65. Żołkiewicz A., 1952: Probliema obrazowanija rieaktiwnych form u bakterij w swietlie uczienija O. Lepieszynskoj, *Usp. Sowrem. Bioł.*, **33** : 101.

Wł. Kunicki-Goldfinger, S. Chariasz i T. Pudo.

HEMOLIZYNY *ESCHERICHIA COLI*

KOMUNIKAT

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie
Wpłynęło dnia 15.I.1955

Związek zachodzący między własnościami chorobotwórczymi *Escherichia coli* a zdolnością jej do hemolizy nie jest nadal jasny.

Wielu badaczy sądziło, że hemolityczne szczepy *E. coli* odznaczają się większą patogennością. Wnioski te oparte były w większości przypadków na obserwacjach pośrednich. Tak więc Dudgeon, Wordley i Bawtree (1922) przy schorzeniach dróg moczopłciowych znaleźli wśród wyosobnionych szczepów *E. coli* u mężczyzn 74%, a u kobiet 30% form hemolitycznych. Na dużą częstość występowania hemolitycznych szczepów *E. coli* w zakażeniach u ludzi zwracali uwagę też Herrold (1922), Löwenberg (1924 wg Nissle 1929), Durante (wg Přibram 1929), Nissle (1929), Kauffmann (1943), Vahlne (1946), Sjöstedt (1946), Evertsen (1947), Biering-Sørensen i in. (1927).

Inni natomiast zależności takiej nie znaleźli (Wramby 1948).

Większą wirulencję szczepów hemolitycznych w stosunku do zwierząt doświadczalnych stwierdzili między innymi Kauffmann (1943), Evertsen (1947), Sjöstedt (1946) Vahlne, (1946). Parnas, Kunicki-Goldfinger i in. (1950) takiej wyraźnej zależności nie wykryli, zanotowali natomiast większą toksyczność endotoksyny szczepów hemolitycznych.

Próbowano łączyć zdolność do hemolizy z szeregiem innych własności *E. coli* (własności glikolityczne, proteoliza, itp.). Rezultaty poszczególnych badań były jednak przeważnie sprzeczne i nie pozwalają na wyciągnięcie jakiegoś uzasadnionego wniosku.

Natura hemolizyn *E. coli* jest również nadal niejasna. Ilość badań na ten temat jest stosunkowo nie duża, a ich wyniki są bardzo rozbieżne.

Kayser (1903) opisał rozpuszczalną hemolizynę *E. coli*, pojawiającą się w starszych hodowlach bulionowych.

Późniejsze prace Grossa (1929, 1930) nie potwierdziły jednak tych rezultatów.

Robinson (1951) w starannie przeprowadzonych badaniach nie znalazł hemolizyn rozpuszczalnych, a czynnik, który rozpuszczał krwinki

w doświadczeniach K a y s e r a, identyfikuje z dwuwęglanem, tworzącym się w czasie wzrostu hodowli.

W r a m b y (1948) i P a r n a s i in. (1950) natomiast stoją na stanowisku, że *E. coli* wytwarza rozpuszczalną hemolizynę. D ą b r o w s k i (1951) określa nawet jej własności; według tego ostatniego badacza, wytwarzanie hemolizyn osiąga wysoki poziom już w 6-cio godzinnej hodowli.

Problem jest zatem nadal równie niejasny jak uprzednio.

BADANIA WŁASNE

Badania przeprowadzono na 7 hemolitycznych szczepach *E. coli* pochodzenia zwierzęcego: No 9, 32, 37, 39, 47, 77 i 96 *) oraz na 1 szczepie niehemolitycznym, jako kontroli.

Wszystkie szczepy pod względem biochemicznym zachowywały się jak typowe *E. coli*. Szczepy hemolityczne na agarze z krwią końską tworzyły wokół kolonii strefy zupełnego rozpuszczenia krwinek szerokości 2 — 3 mm.

I. Szczepy badane hodowano na następujących płynnych podłożach: 1) zmodyfikowana pożywka Kosera (CH_3COONa — 2 g, $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$ — 1,5 g, KH_2PO_4 — 1,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2 g, woda — do 1000 ml). 2) woda peptonowa (pepton — 1%, NaCl — 0,5%), 3) bulion odżywczy (pepton — 10 g, NaCl — 5 g, wyciąg mięsny — 1000 ml).

Do butelek jenajskich, zawierających po 50 lub 100 ml odpowiedniej pożywki, wsiewano po 0,5 lub 1 ml zawiesiny bakterii o gęstości $3 \cdot 10^8$ komórek w 1 ml, sporządzonej ze spłuczyny z 24-godzinnego wzrostu na agarze odżywczym.

Hodowle prowadzono w 37° przez 18, 24 i 96 lub 144 godzin po czym poddawano je sączeniu przez świecę Chamberlanda L_5. Część prób wirowano. Okazało się jednak, że wirowanie hodowli przez 15 do 30 minut przy 4000 — 6000 obrotów na minutę, stosowane przez D ą b r o w s k i e g o (1951), niezawsze zapewniało zupełne oddzielenie bakterii od płynu.

W przesączach i płynach ściągniętych z ponad osadu bakteryjnego po wirowaniu poszukiwano hemolizyn bakteryjnych. W tym celu sporządzano z nich w jałowych warunkach rozcieńczenia w roztworze soli fizjologicznej (do 1 : 32). Jednocześnie 1 ml płynu wysiewano na płytkę agarową, celem skontrolowania jałowości. Płyny nierozcieńczone oraz ich rozcieńczenia rozlewano po 1 ml do probówek aglutynacyjnych i dodawano po 1 kropli 5%-ej zawiesiny krwinek (baranich, końskich, króliczych i ludzkich).

Po wymieszaniu składników wstawiano probówki do cieplarki o temperaturze 37°, wstrząsając je następnie co jakiś czas.

Wyniki odczytywano co 15 minut przez 4 godziny oraz po 24 godzinach.

* Szczepy otrzymano z Zakładu Mikrobiologii Wet. UMCS za co ówczesnemu Kierownikowi tego Zakładu prof. dr J. P a r n a s o w i oraz adiunktowi dr T. D ą b r o w s k i e m u składamy serdeczne podziękowanie.

Żaden z przesączów ani płynów po odwirowaniu nie wywoływał hemolizy, jeśli tylko nie zawierał zupełnie bakterii.

Jak już wspomniano, po wirowaniu często pozostawały w płynie pojedyncze osobniki bakteryjne. W takich przypadkach, o ile dotyczyło to szczepu hemolitycznego, obserwowano rozpuszczenie krwinek.

H. Robinson (1951) zauważył, że hemoliza, zachodząca w obecności żywych komórek *E. coli*, jest aktywowana przez jony Ca^{++}.

Wykonano więc próby przy użyciu podłoża płynnego zaproponowanego przez Robinsona.

Celem zbadania, czy ewentualne wytwarzanie hemolizyn nie jest indukowane przez swoisty substrat, prowadzono hodowle na:

1. Podłoże Robinsona + 0,17% hemoglobiny (Difco) *)
2. Zmodyfikowane podłoże Kosera + 0,2% hemoglobiny
3. Bulion + 0,6% hemoglobiny
4. Zmodyfikowane podłoże Kosera + 1% stromy shemolizowanych krwinek **)
5. Bulion + 2% stromy **)
6. Zmodyfikowane podłoże Kosera + 0,75% objęt. żółtka jaja kurzego (jako źródło lecytowiteliny).
7. Bulion + 2% obj. żółtka.

Wykonanie właściwych prób pozostało takie same jak w punkcie I.

W żadnym z badanych przypadków, przy wykonywaniu 4 — 20 równoległych prób, nie stwierdzono wytwarzania hemolizyn rozpuszczalnych.

III. Podobnie nie znaleziono hemolizyn rozpuszczalnych przy nawietrzaniu hodowli *E. coli* w podłożu Kosera lub w bulionie.

Bez wpływu pozostało również dodawanie do bulionu surowicy końskiej w ilości 5% oraz stosowanie bulionu jałowionego przez sączenie, co według Todda (1938) ma ułatwić wytwarzanie hemolizyn przez paciorkowce.

IV. Opierając się na obserwacjach Buchgrabera i Hilko (1934), według których łączna hodowla *E. coli* z hemolitycznym gronkowcem wzbudza u pałeczek zdolności do hemolizy, wykonano następujący eksperyment:

Szczepy *E. coli* No 77 i 96 hodowano w bulionie łącznie z *B. subtilis*, dającym silną hemolizę. Po 10 dniach inkubacji wyizolowano pałeczki okrężnicy i przebadano ich zdolność do wytwarzania hemolizyn w 6-dniowej hodowli bulionowej. Rozpuszczalnych hemolizyn nie znaleziono.

V. Niemożność znalezienia hemolizyn w przesączach lub płynach ściągniętych po wirowaniu mogła wynikać z dużej ich wrażliwości na działanie czynników zewnętrznych i z szybkiej inaktywacji. Dlatego

*) hemoglobinę jałowiono przez sączenie.

**) pożywek tych używano w ilości po 10 ml.

Erytrocyty baranie płukano w płynie fizjologicznym, po czym hemolizowano je w wodzie destylowanej przez 24 godziny w temperaturze 1 — 2°. Następnie zawiesinę wirowano, parokrotnie płukano płynem fizjologicznym, suszono w próżni i ważono. Wszystkie zabiegi wykonywano w sposób jałowy.

też przeprowadzono poniższą próbę, w której hemolizyny w razie ich wytwarzania działałyby od razu na krwinki.

W tym celu szczep No 39 hodowano w 2 ml. wody peptonowej, w małych woreczkach kolodionowych, nie przepuszczających bakterii *).

Woreczki z hodowlą umieszczano w dużych probówkach w 6 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej z dodatkiem 0,25 ml 5% zawiesiny krwinek.

Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°. Wytwarzania hemolizyn rozpuszczalnych nie stwierdzono. W przypadku rozpuszczania krwinek zawsze udało się wykazać, że bakterie wskutek nieszczelności woreczków kolodionowych przenikały do płynu fizjologicznego.

VI. Znalezienie hemolizyn rozpuszczalnych okazało się niemożliwe. Postanowiono przeto sprawdzić, czy rozbicie komórek bakteryjnych nie uwolni z ich wnętrza substancji zdolnych do rozpuszczenia krwinek.

Szczepy No 9, 47, 77 i 96 hodowano przez 36 godzin w bulionie i w zmodyfikowanej pożywce Kosera, po czym dodawano do nich fenolu do stężenia 0,2% i pozostawiano w temperaturze 37° na okres 5 tygodni.

Kontrolę stanowiła sama pożywka z dodatkiem 0,2% fenolu, przetrzymywana przez 5 tygodni w cieplarce.

Następnie hodowle odwirowano, płyn z nad osadu ściągnięto, skontrolowano jego jałowość i przebadano własności hemolizujące. Wyniki ilustruje tabela I.

Tabela I

Hemolizujące działanie autolizatów *E. coli*
(inkubacja: 37°, 1 godzina)

Гемолизирующее действие автолизатов *E. coli* (инкубация. 37°, 1 час).

Haemolytic property of *E. coli* autolysates.

		Szczep			
	Rozcieńczenie autolizatu	9	47	77	96
Siła hemolizy	1:0	++	+++	+++	++++
	1:4	+	++	++	+++
	1:16	—	+	+	+
	1:32	—	—	—	—

++++ hemoliza zupełna; полный гемолиз; complete haemolysis
+++ „ silna; сильный strong „
++ „ słaba; слабый weak „
+ „ b. słaba; очень слабый very weak „
— brak hemolizy; отсутствие гемолиза no

Widoczne jest, że autolizaty zawierają jakieś substancje zdolne do rozpuszczenia krwinek.

* woreczki sporządzono według przepisu Calmette (1948).

DYSKUSJA

Liczne próby otrzymania rozpuszczalnych hemolizyn *E. coli*, przy zastosowaniu różnych pożywek i różnych warunków hodowli, potwierdziły wyniki Grossa (1929, 1930) i Robinsona (1951). *E. coli* hemolizyn rozpuszczalnych nie wytwarza. Przyczyn nie znajdywania hemolizyn nie należy szukać w ich ewentualnej adsorbcji na filtrach, gdyż centryfugaty hodowli, jeśli tylko wolne były od bakterii, również nie powodowały hemolizy. Również szybka inaktywacja hemolizyn nie mogła być przyczyną niemożności ich wykrycia, jak świadczy o tym eksperyment V — w którym hemolizyny, o ile byłyby wytwarzane, mogłyby oddziaływać wprost na krwinki, oddzielone od hodowli błoną kolodionową.

Nie udało się też pobudzić pałeczek okrężnicy do wytwarzania hemolizyn przez zadziałanie hemoglobiną, stromą krwinek i lecytyną żółtka jaja kurzego.

Podobnie bez efektu pozostały próby indukcji wytwarzania hemolizyn przez łączną hodowlę *E. coli* z laseczką hemolityczną.

Wydaje się zatem, że wyniki Dąbrowskiego (1951), według którego *E. coli* wytwarza rozpuszczalne hemolizyny, są spowodowane mylną interpretacją.

Niedostateczne wirowanie często pozostawia w centryfugacie pojedyncze bakterie. Jak wynika z naszych badań, wystarczy by płyn zawierał kilkadziesiąt komórek na 1 ml, aby był zdolny do wywołania hemolizy.

Stwierdzono jednocześnie, że *E. coli* rozmnaża się w zawiesinie krwinek, co tłumaczy zwiększenie się natężenia hemolizy w miarę przedłużania okresu obserwacji.

Tym też możnaby tłumaczyć to, że Dąbrowski znajdywał maksimum „wytwarzania hemolizyn" w 6-godzinnych i starszych hodowlach. Młodsze hodowle, pozostające w okresie fazy zastoju lub początku fazy logarytmicznej, zawierały komórki stosunkowo duże, łatwiej dające się oddzielić przez wirowanie.

Hodowle 6-godzinne i starsze składały się natomiast z osobników znacznie mniejszych, nie dających się w pełni odwirować.

Wydaje się, że hemoliza *E. coli* jest związana z obecnością żywych bakterii.

Hemolizujące własności autolizatów możnaby było interpretować następująco. System hemolityczny u *E. coli* jest układem adaptacyjnym, indukowanym przez nieokreślone jeszcze czynniki, obecne w krwinkach.

Czynnikiem tym nie jest hemoglobina, stroma krwinek otrzymana drogą plazmolizy, lecytyna żółtka jaja kurzego.

Należy jednak zaznaczyć, że plazmolizowane krwinki poddawane były dodatkowo suszeniu, a wszystkie te zabiegi mogły spowodować zmianę cech stromy.

System hemolityczny znajduje się w normalnych komórkach w ilościach śladowych, dlatego wykrycie jego staje się możliwe dopiero po masowej długotrwałej autolizie komórek.

Nie jest jednak wykluczone, że czynnik hemolityczny, wykrywany w autolizatach, nie jest normalnym składnikiem komórki, a artefaktem powstającym z białek bakteryjnych pod wpływem stosowanego przez nas fenolu.

Stwierdzenie tego wymagałoby zastosowania subtelniejszych metod rozbicia komórek.

Вл. Куницки-Гольдфингер, С. Хариаш и Т. Пудо

ГЕМОЛИЗИНЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

Резюме

Авторами исследовано 7 гемолитических штаммов *E. coli* при применении разнообразных питательных сред и при разных условиях выращивания. Не обнаружено образования *E. coli* растворимых гемолизин.

Попытки стимулировать бактерии к образованию гемолизин при помощи специфического субстрата (гемоглобин, основа красных кровяных телец, лецитин) или путем совместной культуры с сенной гемолитической палочкой встретились с неудачей. Однако авторами обнаружены гемолитические свойства автолизатов *E. coli*.

По мнению авторов гемолитическая система *E. coli* имеет приспособительный характер, нормально выступая в клетках в весьма ничтожном количестве. Для стимулирования процесса образовывания гемолизин необходимо по всей вероятности непосредственное соприкосновение бактериальной клетки с эритроцитом.

Wł. Kunicki-Goldfinger, St. Chariasz and *T. Pudo*

THE HAEMOLYSIN OF *ESCHERICHIA COLI*

Summary

The ability to produce exocellular haemolysin in seven strains of haemolytic *E. coli* has been studied. The various media and various conditions of the incubation were used.

In no instance the soluble haemolysin was found.

All attempts to induce the haemolysin production by appropriate substrats (haemoglobin, stroma of erythrocytes, lecitin) or by cultivating *E. coli* in mixed cultures with haemolytic *Bacillus* gave no positive results.

It was shown that after autolysis of bacteria the filtrates gained the haemolytic property (see Table I).

The haemolysin is, according to the authors opinion, an adaptive enzymic system. The inducing substance (or substances) contained in the erythrocytes is active only by direct contact with bacterial cell.

LITERATURA

1. Biering-Sörensen K., Knipschildt H. E., v. Magnus H. S., Tulinius E. V., 1947: Communic de l'Inst., Serotherap. de l'Etat Danois, vol. **37**.
2. Buchgraber J. u. Hilko I., 1934: Über die Frage der Colihämolyse, *Zentr. Bakt. I, Orig.*, **133** : 449.

3. Calmette A., 1948: Microbiologie et sérologie, Masson et Cie., Paris.
4. Dąbrowski T., 1951: O hemolizynach *E. coli*, Annales *UMCS, Sectio DD*, **6** : 273.
5. Dudgeon L. S., Wordley E. a. Bawtree F., 1922: On *Bac. coli* infections of the urinary tract especially in relation to haemolytic organisms, *J. Hyg.*, **21** : 168.
6. Evertsen H. W., 1947:*Acta pathol. microbiol. Scand.*, **24** : 251.
7. Gross H., 1929: Über Colitoxine, *Zentr. Bakt., I Orig.*, **111** : 317.
8. Gross H., 1930: Die Hämolysine und Nekrosegifte der Staphylokokken, Streptokokken und Colibazillen, *Zentr. Bakt., I, Orig.*, **115** : 367.
9. Herrold R. D., 1922: The relation of the colon bacilli of renal infections to strains from other sources and observations on the haemolytic coli bacilli, *J. Urol.*, **7**.
10. Kauffmann F., 1943: *Acta pathol. microbiol. Scand.*, **20** : 21.
11. Kayser H., 1903: Bakterienhämolysine im Besonderen das Colilysin., *Ztschr. Hyg. u. Infektionskrnkh.*, **42** : 118.
12. Nissle A., 1929: Die Coli-bakterien und ihre pathogene Bedeutung w W. Kolle, R. Kraus u. P. Uhlenhut — Handbuch der pathog. Mikroorganismen B. VI, T. 1, G. Fischer u. Urban u. Schwarzenberg, Jena, Berlin.
13. Parnas J., Kunicki-Goldfinger Wł., Stępkowski S., Lorkiewicz Z. i Dąbrowski T., 1950: Badania nad hemolitycznymi szczepami pałeczki okrężnicy wyosobnionym z prosiąt, *Annales UMCS. Sectio DD*, **5** : 355.
14. Přibram E., 1929: Hämotoxine und Antihämotoxine der Bakterien. w W. Kolle, R. Kraus u. P. Uhlenhut — Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, B-II, T 1, G. Fischer u. Urban u. Schwarzenberg, Jena, Berlin.
15. Robinson G. L., 1951: The haemolysin of *Bacterium coli*, *J. gen. Microbiol.*, **5** : 788.
16. Sjöstedt S., 1946: *Acta pathol. microbiol. scand.*, Suppl. 63.
17. Todd E. W., 1938: The differentiation of two distinct serological varietes of streptolysins, Streptolysin O and Streptolysin S., *J. Path., Bact.*, **67** : 423.
18. Vahlne G., 1946: *Acta pathol. microbiol. scand.*, Suppl. 62.
19. Wramby G., 1948: Investigations into antigenic structure of *B. coli* isolated from calves., Uppsala.

B. Dudziak

KIEŁKOWANIE I WZROST AMEB W ZALEŻNOŚCI OD POKARMU BAKTERYJNEGO

KOMUNIKAT

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej U. M. C. S. w Lublinie *)
Wpłynęło dnia 3.II.1955

Skład jakościowy i ilościowy mikroflory glebowej w dosyć znacznym stopniu zależy bezwątpienia od oddziaływania na nią mikrofauny, a zwłaszcza pełzaków.

Ilość ameb w glebie może być bardzo duża, np. znaleziona przez Brzezińską-Dudziak (1954) wynosi ponad 1.690.000 na gram gleby.

Singh (1945) wykazał, że ameby są bardzo wybredne w stosunku do pokarmu bakteryjnego. Pewne bakterie są dla nich dobrym pokarmem, inne natomiast tylko w małym stopniu lub zupełnie nie nadają się jako pokarm. Singh (1945) badał wiele szczepów bakterii glebowych i wiele gatunków ameb. Okazało się, że bakterie będące dobrym pokarmem dla jednego gatunku ameb są przeważnie także chętnie zjadane przez inne pełzaki, a również przez inne pierwotniaki.

Kompleks własności bakterii, dzięki któremu stanowią one odpowiedni pokarm dla ameb, nie jest zależny od ich zachowania się przy barwieniu metodą Grama, od ruchliwości i od zdolności do tworzenia enzymów proteolitycznych. Natomiast stwierdzono, że bakterie tworzące pigment nie są na ogół zjadane przez ameby. Niektóre pigmenty bakteryjne np. pyocjanina działają na ameby zabójczo. To tłumaczy w pewnym stopniu „niejadalność" pewnych szczepów bakteryjnych. Jednak wiele bakterii niepigmentotwórczych nie może służyć jako pokarm dla pełzaków. Zbadanie mechanizmu wzajemnego działania pierwotniaków i bakterii jest zagadnieniem ciekawym zarówno pod względem teoretycznym jak i praktycznym.

*)Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr Kunickiego-Goldfingera, za co składam Mu serdeczne podziękowanie.

BADANIA WŁASNE

Celem pracy było zbadanie wpływu pokarmu bakteryjnego na kiełkowanie i wzrost ameb.

Badania przeprowadzono na małej amebie glebowej (10—20 μ) nieoznaczonego gatunku oraz 15-tu szczepach bakterii glebowych również nieoznaczonych, zarówno gramdodatnich jak i gramujemnych. Hodowlę ameb prowadzono na płytkach agarowych (1% agaroid + 0,5% NaCl), jako pokarm podając im *Aerobacter aerogenes*. Szczepy bakteryjne przechowywano na skośnym agarze odżywczym. Do badań stosowano zawsze hodowlę 24-godzinną. Używano zawiesinę cyst ameb zebranych z płytek lub w niektórych przypadkach cysty pobierano wprost z płytek przy pomocy ezy.

METODYKA BADAŃ

Na krążki z agaru nieodżywczego o średnicy 1,5 cm (1% agaroid + + 0,5% NaCl) nanoszono ezą materiał pobrany z hodowli bakteryjnej. Następnie na powierzchnię wysiewano cysty ameb. Ilość wysianych cyst oznaczano ściśle, licząc je pod mikroskopem. Hodowlę inkubowano w temperaturze pokojowej, notując codziennie ciepłotę powietrza. Następnie liczono ameby i cysty po 18-tu 24, 36, 48 godzinach oraz po 3, 4 i 5 dniach.

Metody dotychczas stosowane nie pozwalały na ilościowe określenie wartości bakterii jako pokarmu dla ameb. Dla otrzymania danych porównawczych okazało się konieczne mierzenie intensywności kiełkowania i przyrostu ilości ameb w zależności od podanego im pokarmu bakteryjnego. W związku z tym wyprowadzono współczynnik kiełkowania K i współczynnik przyrostu α. Współczynnik kiełkowania $K = \frac{n \cdot 100}{N \cdot t}$ gdzie

N — wyjściowa ilość cyst
n — ilość cyst, które wykiełkowały po czasie t
t — czas obserwacji

współczynnik przyrostu $\alpha = \frac{a}{n \cdot t}$ gdzie

n — ilość cyst wykiełkowanych po czasie t
a — ilość ameb po czasie t
t — czas obserwacji.

WYNIKI

W czasie badań zauważono duży wpływ temperatury zarówno na szybkość kiełkowania jak i wzrost ameb. Wpływ ten ilustruje tablica I podająca wartość K pięciu szczepów w dwu różnych temperaturach oraz podobnie skonstruowana tablica II zawierająca wartość α.

Tabela I

Wpływ temperatury na kiełkowanie cyst ameb
Влияние температуры на прорастание цист амеб.
The effect of the temperature on the excystment
Wartość współczynnika *K*

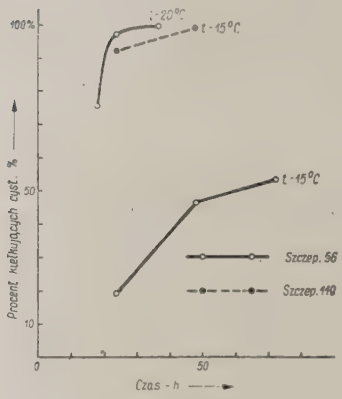
Szczep.	temperatura 15° — 16,8°						temperatura 20° — 22					
	K_{18}	K_{24}	K_{36}	K_{48}	K_{72}	K_{96}	K_{18}	K_{24}	K_{36}	K_{48}	K_{72}	K_{96}
56 pał. gr.—	0	0,83		0,97	0,74		4,20	4,05	2,77			
56 pał. gr.—	0	0,22		0,76	0,58		2,77	4,16	2,77			
85 *Sarcina*	0	0		0,79	0,53		4,04	4,16	2,77			
85 *Sarcina*	0	0		1,63	1,07		4,98	4,16	2,77			
85 *Sarcina*							3,33	3,40		1,90		
70 las. gr.+	0	0		0,95			5,21	3,42	2,93			
70 las. gr.+	0	0		0			1,85	2,77	1,85			
20 pał. gr.—	0	0		1,25	1,04		2,22	1,66		0,83		
20 pał. gr.—							0		1,78			
82 pał. gr.—	0	0		0			3,06	2,3				
82 pał. gr.—	0	0		0,05								

Tabela II

Wpływ temperatury na wzrost ameb Влияние температуры на рост амеб.
The effect of the temperature on the growth of amoebae
Wartość współczynnika α

Szczep	temperatura 15° — 16,8°						temperatura 20° — 22					
	α_{18}	α_{24}	α_{36}	α_{48}	α_{72}	α_{96}	α_{18}	α_{24}	α_{36}	α_{48}	α_{72}	α_{96}
56 pał. gr.—	0	0,055		0,018	0		0,017	0,018	0,100			
56 pał. gr.—	0	0,041		0,056	0,50		0,055	0,054	0,25			
85 *Sarcina*	0	0		0,015	0,20		0,007	0,019	0,058			
85 *Sarcina*	0	0		0,002	0,001		0,006	0,020	0,30			
85 *Sarcina*							0,098	0,096		1,515		
70 las. gr.—	0	0		0			0,005	0,009	0			
70 las. gr.+	0	0		0			0,055	0,041	0			
20 pał. gr.—	0	0		0,010			0		0,097			
20 pał. gr.—							0,028	0,020		0,031		
82 pał. gr.	0	0		0			0,003	0				
82pał. gr.—	0	0		0,02								

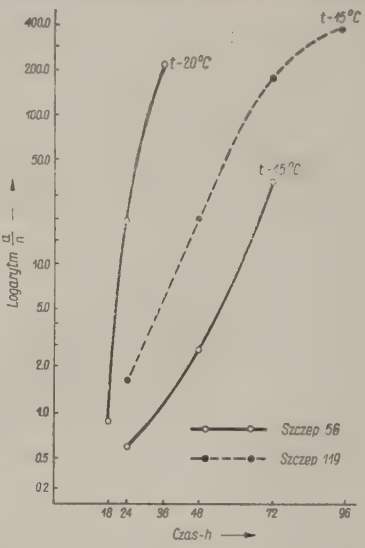
Okazało się, że temperatura 15° nie jest dla hodowli ameb odpowiednia. Najodpowiedniejsza jest temperatura 20° — 22°. Tę temperaturę jako optymalną podaje także S i n g h (1946). R h i n e s (1935) w badaniach nad pierwotniakami i prątkami kwasoodpornymi również zwraca uwagę na wpływ temperatury. Wykazał on, że temperatura 37° jest za wysoka dla pierwotniaków.



Rys. 1. Zależność kiełkowania ameb od temperatury; szczep 56, szczep 119

Рис. 1. Влияние температура на прорастание цист амеб. штамм 56; штамм 119.

Fig. 1. The effect of the temperature on the excystment; strain 56, strain 119.



Rys. 2. Zależność wzrostu ameb od temperatury; szczep 56, szczep 119

Рис. 2. Влияние температура на рост амеб. штамм 56; штамм 119.

Fig. 2. The growth of amoebae in relation to the temperature; strain 56, strain 119.

Ilustracją wpływu temperatury są wykresy 1 i 2, na których przedstawiono zależność K i α od temperatury dla dwu wybranych szczepów: *56* i *119*.

Szczep *56* jest szczepem słabo zjadanym, zaś szczep *119* stanowi dość dobry pokarm dla ameb.

Widoczne jest znaczne zmniejszenie wartości K i α szczepu *56* przy obniżeniu ciepłoty do 15°. Natomiast odnośne wartości szczepu *119* są nawet przy tej temperaturze stosunkowo wysokie.

Prawdopodobnie więc oddziaływanie temperatury i rodzaju pokarmu bakteryjnego jest wzajemnie uwarunkowane.

W optymalnej ciepłocie pełzaki wykorzystują jako pokarm nawet te bakterie, które słabo podtrzymują ich wzrost. W niższej temperaturze aktywność pierwotniaków jest zbyt mała i nie są one w stanie wykorzystać pokarmu mniej odpowiedniego.

Nawet taka niska temperatura nie wstrzymuje jednak ich wzrostu w razie dostarczenia im odpowiedniego (optymalnego) pokarmu.

Nie wykluczone wydaje się ponadto, że bakterie wydzielają do podłoża jakieś substancje stymulujące lub hamujące kiełkowanie. Świadczyłoby o tym to, że podczas gdy w obecności „słabo zjadanych" bakterii kiełkowanie następuje dopiero w temperaturze *ca* 20° i to stosunkowo wolno, to pod wpływem bakterii „dobrze zjadalnych" cysty kiełkują bardzo szybko nawet w 15°.

Wpływ szczepu bakteryjnego na kiełkowanie cyst jest przedstawiony na tablicy III. W obecności niektórych bakterii stanowiących szcze-

Tabela III

Wpływ szczepu bakteryjnego na kiełkowanie cyst.
Влияние разных штаммов бактерий на прорастание цист.
Excystment of amoebae in relation to the strain of bacteria

Szczep	temperatura 15° — 16,8°						temperatura 20° — 22					
	K_{18}	K_{24}	K_{36}	K_{48}	K_{72}	K_{96}	K_{18}	K_{24}	K_{36}	K_{48}	K_{72}	K_{96}
70 las. gr. +	0	0		0,95			5,21	3,42	2,93			
70 las. gr. +	0	0		0			1,85	2,77	1,85			
20 pał. gr. —	0	0		1,25	1,04		2,22	1,66		0,83		
20 pał. gr. —							0		1,78			
82 pał. gr. —	0	0		0			3,06	2,3				
82 pał. gr. —	0	0		0,05								
85 *Sarcina*	0	0		0,79	0,53		4,04	4,16	2,77			
85 *Sarcina*	0	0		1,63	1,07		4,98	4,16	2,77			
85 *Sarcina*							3,33	3,40	1,90			
85 *Sarcina*							5,54	4,17				
56 pał. gr. —	0	0,83		0,97	0,74		4,20	4,05	2,77			
56 pał. gr. —	0	0,22		0,76	0 58		2,77	4,16	2,77			
72 ziarniak gr.+							4,38	3,87		2,08		

Szczep	temperatura 15° — 16,8°						temperatura 20° — 22°					
	K_{18}	K_{24}	K_{36}	K_{48}	K_{72}	K_{96}	K_{18}	K_{24}	K_{36}	K_{48}	K_{72}	K_{96}
61 ziarniakgr.+							3,53	2,65		1,51	1,28	
90 pał. gr. —							3,57	2,89	2,77			
90 pał. gr. —							0,52	2,47	2,69			
119 las. gr. +		3,85		2,08								
119 las. gr. +		3,43		2,77								
119 las. gr. +		2,72		2,08								
D		3,13		2,08								
D		2,77		2,08								
D		2,08		2,08								
120 pał. gr. —		4,00		2,08								
120 pał. gr. —		3,64		2,08								
128 pał. gr. —		4,16										
128 pał. gr. —		4,16										
25 pał. gr. —		4,16										
25 pał. gr. —		4,16										
25 pał. gr. —		4,16										
110 las. gr. +		4,16										
110 las. gr. +		4,16										
110 las. gr. +		4,16										

gólnie dobry pokarm dla pełzaków, wzrost i kiełkowanie zachodzi nawet w temperaturze 15 — 16,8° (szczep *119, D, 120, 128, 25, 110*). W obecności jednak szczepów słabo spożywanych przez ameby, pełzaki kiełkują dopiero w temperaturze 20°, a w temperaturze 15° kiełkowanie jest minimalne lub nie zachodzi w ogóle (szczep *20, 70, 82, 56, 85*).

Wyniki badań nad wpływem szczepu na kiełkowanie znajdują potwierdzenie w literaturze (C r u m p 1950).

Jeszcze wyraźniej przedstawia się wpływ szczepu bakteryjnego na wzrost ameb (Tab. IV).

Tabela IV

Wpływ szczepu bakteryjnego na przyrost ameb.
Влияние разных штаммов бактерий на рост амеб.
The growth of amoebae in relation to the type of bacteria

Szczep	temperatura 15° — 16,8°						temperatura 20° — 22					
	α_{18}	α_{24}	α_{36}	α_{48}	α_{72}	α_{96}	α_{18}	α_{24}	α_{36}	α_{48}	α_{72}	α_{96}
70 las. gr. +	0	0		0			0,005	0,009	0			
70 las. gr. +	0	0		0			0,055	0,041	0			
20 pał. gr. —	0	0		0,010			0		0,097			
20 pał. gr. —							0	0,020		0,031		
82 pał. gr. —	0	0		0			0,003	0				
82 pał. gr. —	0	0		0,02								
85 *Sarcina*	0	0		0,015	0,020		0,007	0,019	0,058			
85 *Sarcina*	0	0		0,002	0,001		0,005	0,020	0,30			
85 *Sarcina*							0,098	0,096		1,515		
85 *Sarcina*							0,004	0,309	1,723			
56 pał. gr. —	0	0,055		0,018	0		0,017	0,018	0,100			
56 pał. gr. —	0	0,041		0,056	0,50		0,035	0,854	6,25			
72 ziarniak gr.+							0,18	0,14		1,34	0,03	

Szczep	temperatura 15° — 16,8°						temperatura 20° — 22°					
	α_{18}	α_{24}	α_{36}	α_{48}	α_{72}	α_{96}	α_{18}	α_{24}	α_{36}	α_{48}	α_{72}	α_{96}
61 ziarniak gr.+							0,019	0,026		0,011	0,025	
90 pał. gr. —							0,037	0,020	0,069			
90 pał. gr. —							0	0,035	0,021			
119 las. gr. +		0,163		0,432	2,393	4,065						
119 las. gr. +		0,072		1,924	1,640							
119 las. gr. +		0,063			3,020	5,405						
D		0,023		0,503		7,335						
D		0,036		0,604		6,215						
D		$0,02_0$		0,553		4,166						
128 pał. gr. —		2,387		3,016	$22,19_0$	13,907						
128 pał. gr. —		2,14		2,5	17,772							
120 pał. gr. —		0,113		1,899	11,66	11,88						
120 pał. gr. —		1,149		1,445	25,379	17,027						
25 pał. gr. —		0,732		1,892		24,869						
25 pał. gr. —		0,659		2,517		23,299						
25 pał. gr. —		0,847		2,361		24,270						
110 las. gr. +		0,861		3,437		35,008						
110 las. gr. +		1,003		3,246		34,288						
110 las. gr. +		0,911		3,732		35,121						

Możemy wyróżnić tu trzy grupy szczepów bakteryjnych. Jedne z nich (szczep *70, 20, 82, 85, 84, 56, 72, 61* i *90*) są szczepami, na których ameby bądź nie rozwijają się wcale, bądź też wzrost ich jest bardzo słaby.

Drugą grupę stanowią szczepy (*119, D*), na których ameby rozwijają się stosunkowo dobrze, ale wolniej i słabiej niż na szczepach grupy trzeciej (*128, 120, 25, 110*), na których rozmnażają się bardzo obficie.

Należy tu podkreślić, że szczepy, na których ameby kiełkują dobrze w temperaturach 20 — 22° a nie kiełkują w temperaturze 15°, są bardzo słabo zjadane i nie podtrzymują wzrostu ameb także w temperaturze 20 — 22°.

Metody stosowane przez badaczy z Rothamsted, opierające się na makroskopowo widocznym „znikaniu" masy bakteryjnej pożeranej przez pełzaki, pozwalają jedynie na wyróżnienie bakterii „zjadanych" i „niezjadanych".

Dzięki zastosowaniu współczynników kiełkowania i przyrostu, wyliczanych na podstawie danych cyfrowych uzyskanych w bezpośrednim liczeniu cyst i ameb pod miskroskopem, okazało się możliwe dokładniejsze scharakteryzowanie szczepów bakteryjnych pod względem ich wartości pokarmowej.

Jest to o tyle ważne, że pozwala rozbić grupę bakterii, które by według danych metod zostały oznaczone jako „niespożywane" przez pełzaki, na dwie podgrupy: pierwszą — bakterii nie dopuszczających do kiełkowania cyst amebowych w suboptymalnych warunkach ciepłoty i nie podtrzymujących ich wzrostu nawet w temperaturze 20°. Bakterie te nie będą niszczone przez pełzaki. Bakterie te, jeśli stanowiły w glebie znaczny odsetek szczepów, mogą stworzyć warunki względnego głodu i zahamowanie przyrostu ilości ameb.

Podgrupa druga obejmuje szczepy podtrzymujące powolny przyrost ameb. Bakterie te w rzeczywistości mogą w warunkach naturalnych zapewnić utrzymanie równie licznej populacji pełzaków jak bakterie „dobrze zjadane" wg terminologii S i n g h a. Ich znaczenie biologiczne będzie więc zupełnie inne niż podgrupy pierwszej.

Z przytoczonych danych wynika, że na wzrost i kiełkowanie ameb ma wpływ zarówno rodzaj użytego pokarmu jak i temperatura hodowli.

Mechanizm tych stosunków nie był w tej pracy badany. Stwierdzono tylko, że barwliwość bakterii metodą Grama nie ma wpływu na wartość ich jako pokarmu dla ameb. W przebadanych szczepach nie było, poza pakietowcem żółtym, żadnych szczepów pigmentowanych. Barwiki żółte wg S i n g h a wywierają najsłabszy ujemny wpływ na ameby. Na tym szczepie ameby rozwijały się jednak stosunkowo dobrze.

Zbadanie mechanizmu, przy pomocy którego bakterie bronią się przed niszczeniem przez ameby, rzuciłoby ciekawe światło na zagadnienie wzajemnych stosunków tych dwu grup mikroorganizmów glebowych. Problem ten jest przedmiotem dalszych badań.

Б. Дудзяк

ПРОРАСТАНИЕ И РОСТ АМЕБ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ БАКТЕРИЯЛЬНОГО КОРМА

Резюме

На основании применяемых до сих пор методов можно было получить лишь качественную характеристику влияния бактерий на прорастание и рост амеб.

Чтобы получить сравнительные данные, автор ввел числовые коэффициенты: коэффицент прорастания $\frac{n \cdot 100}{N \cdot t}$ и коэффициент роста $\alpha = \frac{a}{n \cdot t}$, где N исходное число цист, n — число цист проросших за время t, a — количество амеб за время t.

Исследования производились по видоизмененному методу Сингха (Бржезинска-Дудзяк 1954). Для исследования была использована неопределенная, маленькая, почвенная амеба и 15 штаммов почвенных бактерий. Устанавливалось исходное число цист, а затем число цист и амеб спустя 18, 24, 36, 48, 72, 96 и 120 часов инкубации в комнатной температуре, отмечая при этом температуру воздуха.

Процесс прорастания цист и рост амеб зависит от температуры (Табл. I и II, рис. 1 и 2). Температура 15 — 17° является слишком низкой для амеб.

Многочисленные штаммы бактерий, в присутствии которых амебы не прорастали и совсем не делились или процесс деления протекал очень медленно при температуре 15°, при повышении температуры до 22° поддерживали, хотя очень слабо, рост амеб. Однако в присутствии штаммов хорошо „съедаемых" процесс прорастания и роста амеб протекал сравнительно успешно при низкой температуре (15°).

Макроскопически наблюдаемое исчезание бактериальной массы при выращивании амеб дает лишь возможность выделить штаммы, составляющие для них очень хороший корм и поддерживающие обильное размножение простейших.

Применение же количественного метода состоящего в вычислении коэффициентов k и α позволяет выделить из группы т. н. „слабо съедаемых" бактерий те штаммы, которые благоприятствуют прорастанию и поддерживают рост амеб даже столь медленный, что остается незамеченным при применении качественного метода (Табл. III и IV).

Способность бактерий к окрашиванию по методу Грама не оказывает никакого влияния на их пригодность в качестве корма для амеб

Этот вопрос требует ещё дальнейших исследований.

B. Dudziak

THE INFLUENCE OF THE TEMPERATURE AND OF THE BACTERIAL ENVIRONMENT ON THE EXCYSTMENT AND GROWTH OF SOIL-AMOEBAE

Summary

The methods proposed by Singh gave only qualitative characteristics of the effect of bacterial environment on the excystment and on the growth of amoebae.

It seems then desirable to introduce two coefficients—excystment coefficient K and growth coefficient α. $K = \frac{n \cdot 100}{N \cdot t}$ $\alpha = \frac{a}{n \cdot t}$ where N is the initial number of cysts,

n — is the number of amoebae that excysted in time t; a is a total number of amoebae at time t. In testing the growth of amoebae the modified Singh's method (Brzezińska-Dudziak 1954) was used. An unidentified species of little soil amoeba and 15 strains of soil bacteria were tested.

The number of cysts and of amoebae was determined after 18, 24, 36, 48, 72, 96 and 120 hours of incubation at room temperature (air- temperature was measured during the whole experiment).

The excystment and the growth of amoebae depended on the temperature (Tables I and II, Fig. 1 and 2).

Temperature 15 — 17° was too low. It was shown however that the excystment is dependent, contrary to Crump's (1950) observation, on the presence and the type of bacteria.

Practically no excystment was obserwed in the presence of some strains at temperature 15°.

In the presence of readily eaten strain of bacteria excystment coefficient was relatively high even at 15° (Table III). The rate of growth (measured by coefficient α) was also much higher with readily eaten bacteria.

Using this method is was possible to distinguish among bacteria classified according to Singh's criteria as „not eaten" two groups.

The first group contained strains of bacteria very slowly eaten by amoebae. Nevertheless the excystment was complete and the slow growth continued for a long time (Table IV).

The effect of these and similar bacteria on the soil-amoebae population in natural environment, when the time-factor is of less importance, is probably not quite different from this exerted by „readily eaten" bacteria.

LITERATURA

1. Brzezińska-Dudziak B., 1954: Oznaczanie ilości ameb w glebie wg zmodyfikowanej metody Singha, *Acta Microbiol. Polon.*, **3** : 121.
2. Crump Z., 1950: The Influence of the Bacterial Environment on the Excystment of Amoebae from Soil, *J. Gen. Microbiol.*, **4** : 16.
3. Singh B. N., 1945: The selection of bacterial food by Soil Amoebae, and the toxic effects of bacterial pigments and other products on Soil Protozoa, *Brit. J. exp. Path.*, **20** : 316.
4. Singh B. N., 1946: A method of estimating the numbers of Soil Protozoa, especially amoebae based on their differential feeding on bacteria, *Ann. Appl. Biol.*, **33** : 112.
5. Rhines Ch., 1935: The relationship of Soil protozoa to tubercle bacilli, *J. Bact.*, **29** : 369.

Wł. Kunicki-Goldfinger i *A. Marzec*

WPŁYW TOKSYN BAKTERYJNYCH NA *PARAMAECIUM* (KOMUNIKAT)

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej U. M. C. S. w Lublinie
Wpłynęło dnia 2.II.1955

Badania przeprowadzono na jednym klonie *Paramaecium aurelia*. Hodowlę pierwotniaków prowadzono na pożywce Sonneborna z nawaru sałatowego.

Przebadano działanie toksyn *Clostridium botulinum* typ *A*, *Cl. botulinum* typ *B*, *Cl. welchii* i *Corynebacterium diphteriae* *).

Obserwacje prowadzono przez 24 godziny na wklęsłych szkiełkach podstawowych, mieszając określoną ilość hodowli *P. aurelia* z toksyną lub jej rozcieńczeniem. Notowano czas zabicia połowy osobników *P. aurelia* znajdujących się w preparacie.

Śledzono również przebieg zmian morfologicznych pod mikroskopem, w ciemnym polu widzenia i stosowano barwienie przyżyciowe czerwienią obojętną i błękitem metylenowym.

Celem stwierdzenia swoistości działania badano wpływ toksyn odzjadliwionych przez ogrzewanie, zobojętnianych swoistą surowicą antytoksyczną oraz badano wpływ samego podłoża, na którym otrzymywana była toksyna i samej surowicy.

Stosowane w doświadczeniach toksyny nie zawierały środków konserwujących.

Wyniki zamieszczono w tabeli I.

Widoczne jest, że zabójcze działanie, jakie wywierają przesącze, pochodzi nie od toksyn, lecz od jakichś składników podłoża.

Unieczynnianie jadów przez ogrzewanie lub zobojętnianie ich przy pomocy swoistej antytoksyny nie wpływa na czas zabicia *Paramaecium*.

Natomiast samo podłoże, stosowane do wytwarzania toksyn, wywiera równie silne zabójcze działanie jak i przesącz hodowli.

O tym, że nie toksyna jest aktywnym czynnikiem trującym dla pantofelków, świadczą też obserwacje mikroskopowe. Wykazały one, że

*) toksyny i surowice antytoksyczne otrzymane z PZH w Warszawie i z PZH — Filia w Lublinie, za co składamy tym Instytucjom serdeczne podziękowanie.

Tabela I

Wpływ toksyn bakteryjnych na *Paramaecium aurelia*
(Czas zabicia połowy osobników)

Влияние бактериальных токсинов на *Paramaecium aurelia*. (Время за которое погибает половина индивидов).

The effect of bacterial toxines on *Paramaecium aurelia* (Time at which half of cells were dead)

	rozcieńczenie				
	5:1	1:2	1:3	1:4	1:5
toksyna *Cl. welchii*	10″	20″	10′	24h	cz.
toksyna *Cl. welchii* unieczyniona podgrzewaniem (80°, 1h)	10″	20″	3′	24h	cz.
toksyna *Cl. botulinum* typ A	1′ 40″	3′	1h	3h	6h
toksyna *Cl. botulinum* typ A unieczynniona podgrzewaniem	1′ 50″	4′	1h 30′	3h	6h
toksyna *Cl. botulinum* typ B	10″	1′	10′	N	N
toksyna *Cl. botulinum* typ B unieczynniona przez ogrzewanie	10″	20″	0′	N	N
toksyna *C. diphteriae*	2′	10′	2h	N	N
toksyna *C. diphteriae* zobojętniona surowicą	2′ 20″	10′	2h	6h	N
Pożywka służąca do produkcji toksyny	2′	10′	1h	2h 30′	N
Surowica antytoksyczna	3′	20′	N	N	N

Objaśnienia:

cz. — po 24h przeżyło kilka osobników
N — wszystkie lub prawie wszystkie osobniki żyły po 24h
cz. — some cells living after 24 hr.
N — all or nearly all cells living after 24 hr.

śmierć pierwotniaka poprzedzana jest charakterystycznym zespołem zmian morfologicznych.

W przesączu *Cl. welchii* śmierć nastąpiła bardzo szybko; komórki

kurczą się (do 3/4 normalnej długości), grubieją. Niekiedy komórka pęka. Plazma staje się ziarnista, ciemna. Rzęski ulegają rozpuszczeniu. Czasem wyrzucone zostają trichocysty.

Natomiast przesączе *Cl. botulinum* typ *A* pobudzają najpierw pierwotniaki do ruchu wirowego. Następnie ruch ulega stopniowo coraz silniejszemu zwolnieniu. Wakuole powiększają się znacznie, znikając dopiero po śmierci. Trichocysty nie zostają wyrzucone.

Cl. botulinum typ *B* daje początkowo takie same zmiany jak typ *A*. Jednak po okresie ruchu wirowego komórki przestają się prawie od razu poruszać, pęczniеją przyjmując kształt jajowaty, czasem wyrzucają trichocysty i tworzą pęcherze.

W przesączu hodowli *C. diphteriae Paramaecium* z początku szybko poruszają się i wirują, silnie pęczniеją, przybierając formę gruszkowatą. Ruch słabnie, plazma ulega kondensacji i osobnik ginie, przy czym często wakuola tętniąca zostaje jakby utrwalona. Trichocyst nie widać.

Badania te znajdują częściowe potwierdzenie w dawniejszych pracach Gengou i Miecznikowa (1947) nad wpływem jadów tężcowych i błonniczych na orzęski.

Вл. Куницки-Гольдфингер и А. Мажец

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЯЛЬНЫХ ТОКСИНОВ НА *PARAMAECIUM*

Резюме

Авторами было исследовано влияние токсинов *Clostridium welchii, Cl. botulinum A, Cl. botulinum mun B* и *Corynebacterium diphteriae* на *Paramaecium aurelia*.

Установлено, что причиной губительного действия фильтратов не являются токсины, а составные части субстрата, о чем свидетельствует такой же эффект, вызываемый у простейших токсоидами и незасеянной средой.

Wł. Kunicki-Goldfinger and *A. Marzec*

THE INFLUENCE OF BACTERIAL EXOTOXINES ON *PARAMAECIUM*

Summary

The effect of culture-filtrates containing toxines of *Clostridium welchii, Cl. botulinum* type *A, Cl. botulinum* type *B*, and of *Corynebacterium diphteriae* on the *Paramaecium aurelia* was studied.

It was shown that the toxic effect of these filtrates depends on some ingredients of a culture-medium or on some products of bacterial metabolism.

The filtrates after the inactivation of toxines and the unincubated media had similar protistocidal properties as toxine containing fluids.

LITERATURA

1. Miecznikow I. I., 1947: Niewospriimczіwost' w infiekcjonnych bolieznіach. Wyd. II, AN SSSR, Moskwa.

H. Burzyńska

MIKROFLORA NIEKTÓRYCH WARZYW RYNKU WARSZAWSKIEGO*)

Z Zakładu Badania Żywności P. Z. H. w Warszawie
Wpłynęło dnia 6.XII.1953

W obcym piśmiennictwie spotyka się liczne prace poświęcone zagadnieniu mikroflory warzyw. Autorzy tacy jak Düggeli (1904), Lewitt (1950), Malewicz (wg Alejew i Czistiakowicz 1945) zajmowali się występowaniem drobnoustrojów saprofitycznych na warzywach. Liczni badacze (Tanner 1944, Cruess 1948, Dack 1943, Meyer i Dubowsky 1922, Baumgartner 1949) stwierdzili na warzywach obecność bakterii chorobotwórczych takich, jak *Cl. botulinum, Cl. tetani, Cl. sporogenes, Salmonella, Escherichia coli, Shigella dysenteriae* i inne. Najbardziej dokładną monografię prac poświęconych temu zagadnieniu zawdzięczamy Tannerowi (1944). Ciekawe badania przeprowadzili Meyer i Dubowsky (1922), wykazując olbrzymie rozpowszechnienie *Cl. botulinum* w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie, a częściowo także i w Europie.

Morzycki i współpracownicy (1951) stwierdzili, że wirusy mogą również przenosić się przez warzywa. Zagadnienie to posiada dużą wagę, zwłaszcza ze względu na popularyzowanie surówek i rozwój przetwórstwa warzywnego.

Możliwości zakażenia warzyw bakteriami są bardzo rozległe. Już samo środowisko, w którym bytują rośliny, stanowi bogate źródło zakażenia. Z ziemi i nawozu drobnoustroje z łatwością przedostają się na powierzchnię warzyw. W końcu zakażenie może nastąpić podczas transportu i przechowywania. Doświadczenia wykazały, że warzywa świeże, bezpośrednio zebrane z ogrodu, zawierają mniej bakterii, niż warzywa pobrane ze sklepów lub straganu. O ile mi wiadomo, brak jakichkolwiek przepisów sanitarnych dotyczących transportu i przechowywania warzyw. Warzywa niejednokrotnie przewożone są na wozach, którymi przewozi się również śmiecie i odpadki.

W Polsce badania mikroflory warzyw nie były przeprowadzane. Dlatego z inicjatywy prof. dr K. Bassalika podjęto opracowanie pewnego fragmentu tego tematu, a mianowicie mikroflory niektórych

*) praca wykonana pod kierownictwem Profesora Doktora Nauk Kazimierza Bassalika.

warzyw rynku warszawskiego: sałaty, kopru, pomidorów, kapusty, zielonej pietruszki. Szczególną uwagę zwrócono na laseczki zarodnikujące beztlenowe i pałeczki gramujemne, a to ze względu na możliwość występowania wśród nich bakterii chorobotwórczych.

BADANIA WŁASNE

Badania niniejsze przeprowadzano w okresie letnim i jesiennym 1951 roku. Warunki meteorologiczne tego roku wybitnie nie sprzyjały rozwojowi drobnoustrojów na powierzchni roślin. Silne nasłonecznienie oraz długotrwała susza były czynnikami, które działały zabójczo lub hamująco na rozwój mikroorganizmów.

Badania składały się z dwóch etapów: z badań letnich, podczas których główną uwagę zwrócono na bakterie chorobotwórcze, pomijając zupełnie mikroflorę saprofityczną i z badań jesiennych, w których uwzględniono także drobnoustroje saprofityczne oraz stopień zanieczyszczenia warzyw i wpływ mycia na ilość drobnoustrojów na warzywach.

METODYKA

Próby były pobierane ze sklepów i straganów. Każdą próbę pobierano oddzielnie w wyjałowiony papier. Posiewy wykonywano tego samego dnia. Jałowymi nożyczkami krajano na wyjałowionej płytce warzywo, odważano 5 g na szkiełku zegarkowym (przepłukanym alkoholem i opalonym) i próbkę przenoszono do szklanego słoika objętości 100 ml z doszlifowanym korkiem. Dodawano 45 ml jałowego roztworu fizjologicznego (0,85% NaCl) i silnie wstrząsano, aby zmyć wszystkie drobnoustroje. Identyczną metodę stosowano do wszystkich warzyw z wyjątkiem pomidorów, które płukano na szalce określoną ilością roztworu fizjologicznego. W ten sposób otrzymano rozcieńczenie 1/10. Dalsze kolejne rozcieńczenia robiono tak, aby ilość kolonii na płytce nie przekraczała 300.

Po 1 ml z rozcieńczenia 1/10 posiewano na następujące podłoża: pożywkę Wrzoska, dla wykrycia laseczek beztlenowych, na pożywkę z seleninem sodu dla pałeczek z rodzaju *Salmonella* i na pożywkę Endo dla stwierdzenia obecności bakterii z grupy pałeczki okrężnicy i pałeczek z rodzaju *Shigella*, a na płytkę z krwią dla wykrycia hemolizujących gronkowców i paciorkowców.

Dla stwierdzenia typów bakterii saprofitycznych występujących na warzywach posiewano po 1 ml z rozcieńczeń 1/10 000, 1/100 000 i 1/1000 000 na płytki z 1,5%-owym agarem. Płytki pozostawiano w temperaturze pokojowej na 48–72 godzin. Bakterie znajdowane często na warzywach izolowano na agary skośne. Obserwowano wzrost na agarze skośnym, ruchliwość, zarodniki. Komórki barwiono metodą Grama, mierzono wielkość bakterii oraz oznaczano ich własności biochemiczne.

Przy określaniu szczepów posługiwano się kluczem Bergeya i Topleya. Identyfikację szczepów chorobotwórczych przeprowadzano stosując metodę badań używaną w Państwowym Zakładzie Higieny.

Drożdże i pleśnie hodowano na agarze z brzeczką w temperaturze 30° w ciągu 48—72 godzin. Bliższym ich określeniem nie zajmowano się, obserwowano tylko wygląd kolonii na brzeczce, kształt komórek i ich wielkość.

STOPIEŃ ZANIECZYSZCZENIA WARZYW DROBNOUSTROJAMI

W celu oznaczenia ilości bakterii na warzywach, posiewano po 1 ml materiału z rozcieńczeń 1/10 000, 1/100 000 i 1/1000 000 na płytki z aga-

Tabela I

Ilość bakterii na warzywach (pietruszka zielona)
Количество бактерий на овощах (зеленая петрушка)
Plate count of bacteria on the parsley (per 1 g)

Data	Skąd	Ilość bakterii na 1 g świeżej pietruszki
27.IX.52	Tamka	7.000.000
,,	,,	300.000
29.IX.51	..	6.500.000
,,	,,	650.000
2.X.51	,,	420.000
5.X.51	Mokotów	2.830.000
,,	,,	2.830.000
8.X.51	,,	1.300.000
9.X.51	,,	2.800.000
12.X.51	,,	980.000
18.X.51	,,	2.690.000
,,	,,	3.000.000
23.X.51	,,	500.000
30.X.51	,,	1.500.000
,,	,,	1.070.000
3.XI.51	,,	6.920.000
,,	,,	6.300.000
6.XI.51	,,	40.000.000
,,	,,	7.200.000
12.XI.51	,	2.450.000

Tabela II

Ilość bakterii na szpinaku, przed i po myciu
Количество бактерий на шпинате до и после промывания
The effect of washing on the bacterial count of the spinage

Data	Skąd	Ilość bakterii na 1 g świeżego szpinaku	Ilość bakterii na 1 g świeżego szpinaku mytego	Ilość bakterii pozostała po myciu na świeżym szpinaku w %%	
27.IX.51	Tamka	132.800.000	3.260.000	2,4%	myte pod kranem
2.X. 51	,,	970.000.000	28.400.000	2,9%	
5.X. 51	Moko-	8.000.000	190.000	2,4%	
8.X. 51	tów	5.200.000	140.000	2,7%	
12.X. 51	,,	69.200.000	1.000.000	1,4%	
18.X. 51	,,	208.000	—	—	—
20.X. 51	,,	490.000	130.000	26,5%	myte na misce
23.X. 51	,,	11.500.000	4.640.000	40,3%	
26.X. 51	,,	20.400.000	4.600.000	22,5%	
30.X. 51	,,	11.600.000	2.980.000	25,7%	

Tabela III

Ilość bakterii na kapuście, przed i po myciu

Количество бактерий на капусте до и после промывания

The effect of washing on the bacterial count on the cabbage

Data	Skąd	Ilość bakterii na 1 g świeżych liści kapusty	Ilość bakterii na 1 g świeżej mytej kapusty	Ilość bakterii pozostała po myciu na liściach kapusty w %%	
27.IX.51	Tamka	46.000.000	4.500.000	9,4%	
3.X. 51	,,	36.000.000	3.200.000	8,8%	
9.X. 51	Moko-	47.000.000	1.400,000	2,9%	
12.X. 51	tów	68.000.000	1.440.000	2,1%	myte pod
18.X. 51	,,	13.000.000	180.000	1,3%	kranem
23.X. 51	,,	3.600.000	28.000	0,8%	
6.X. 51	,,	21.800.000	—	—	
9.X. 51	,,	15.300.000	1.200.000	7,8%	
12.X. 51	,,	8.400.000	210.000	2,5%	

Tabela IV

Zestawienie ilości bakterii na sałacie, na liściach zewnętrznych, wewnętrznych, przed i po myciu pod kranem

Количество бактерий на наружных и внутренних листьях салата до и после промывания

The effect of washing on the bacterial count of the outer and inner leaves of the lettuce

Data	Skąd	Ilość bakterii na 1 g zewn. świeżych liści sałaty	Ilość bakterii na 1 g wewn. świeżych liści sałaty	Ilość bakterii na 1 g mytych zewn. liści	Ilość bakterii pozostałych po myciu na zewn. liściach w %%
27.IX.51	Tamka	274.400.000	10.480.000	44.800.000	16,3%
29.IX.51	,,	235.300.000	7.369.000	42.300.000	17,9%
3.X. 51	,,	800.000.000	3.000.000	2.300.000	0,4%
5.X. 51	Moko-	142.000.000	4.000.000	1.340.000	0,9%
9.X. 51	tów	55.000.000	110.000	2.295.000	4,2%
12.X. 51	,,	99.000.000	1.720.000	1.800.000	2,0%
15.X. 51	,,	75.000.000	1.250.000	1.300.000	1,7%
18.X. 51	,,	70.000.000	5.420.000	848.000	1,2%
20.X. 51	,,	14.400.000	280.000	890.000	5,2%
23.X. 51	,,	18.600.000	300.000	900.000	4,9%
26.X. 51	,,	15.400.000	1.345.000	880.000	5,7%
30.X. 51	,,	6.500.000	1.108.000	474.000	7,3%
3.X. 51	,,	4.400.000	1.000.000	420.000	9,5%
12.X. 51	,,	3.200.000	1.112.000	470.000	14,6%

rem. Po 72 godzinach hodowania w temperaturze 30° obliczano ilość drobnoustrojów na 3 równoległych płytkach i oznaczano średnią, a następnie obliczano ilość bakterii w 1 g warzywa. Wyniki umieszczono w tabelach I, II, III i IV.

Jak widać z tabel, zanieczyszczenie warzyw drobnoustrojami jest znaczne. Świeża sałata, koper, pietruszka zawierały średnio kilkadziesiąt milionów bakterii na 1 g warzywa, szpinak kilkanaście milionów, kapusta kilka milionów.

Ponadto wykonano kilka doświadczeń w celu określenia zanieczyszczenia warzyw przez bakterie z grupy pałeczek okrężnicy, posiewając po 1 ml materiału z rozcieńczeń 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000 i 1/100 000 na podłoże Kessiera Swenartona. Wynik odczytywano po 48 godzinach trzymania probówek w temperaturze 37°. Przeciętne miano *coli* wynosiło 1/100 tysięcy; dowodzi to znacznego zakażenia bakteriami z grupy pałeczki okrężnicy.

TYPY BAKTERII WYIZOLOWANE Z WARZYW

Na warzywach stwierdzono obfitą i różnorodną mikroflorę. Zestawienie drobnoustrojów bytujących na warzywach podano w tabeli V.

Na 53 posiewy warzyw wyizolowano 26 szczepów beztlenowców. Z tego zidentyfikowano 7 szczepów: 2 szczepy *Cl. botulinum*, 3 *Cl. welchii* i 2 *Cl. sporogenes*. Pozostałe szczepy beztlenowców nie zostały dokładnie określone.

Wyizolowano dość liczne pałeczki z grupy okrężnicy — określono 22 szczepy: 2 typowe *Escherichia coli*, resztę stanowiły *Aerobacter aerogenes, intermedium* i *paracoli*.

Nie stwierdzono w żadnej próbie bakterii z rodzaju *Salmonella* i *Shigella*, jak również hemolizujących gronkowców i paciorkowców.

Z tlenowej mikroflory saprofitycznej wykazano *Bacillus mesentericus, B. subtilis, Pseudomonas liquefaciens, Serratia marcescens*, stwierdzono również bakterie z rodzin: *Micrococcaceae, Bacteriaceae* obok powyższych, *Bacillaceae, Achromobacteriaceae* i bliżej niezidentyfikowane, ale dość liczne formy drożdży i pleśni.

Najbardziej urozmaiconą mikroflorę spotykano na sałacie. Przewagę na sałacie stanowiły pałeczki gramujemne, reprezentowane przez *Bact. coli* i *Pseudomonas fluorescens liquefaciens*. Bakterie z grupy pałeczki okrężnicy stwierdzono w 21 próbach na 29 posiewów sałaty. Poza tym dość często i licznie występowała *B. mesentericus*. Na sałacie spotykano więcej beztlenowców, niż na innych warzywach. W dwóch wypadkach wykryte laseczki *Cl. botulinum* typ *A* i *B* wyizolowano właśnie z sałaty. Również z sałaty wyhodowano *Cl. welchii* i *Cl. sporogenes*.

Pietruszka i koper miały bardziej jednostajną mikroflorę w porównaniu z innymi warzywami. Na 11 posiewów pietruszki, tylko w dwóch próbach stwierdzono laseczki beztlenowe, których nie udało się zidentyfikować. Zanieczyszczenia bakteriami z grupy pałeczki okrężnicy były stosunkowo niskie. Na 11 posiewów tylko w dwóch wypadkach wykazano ich obecność. Stwierdzono również liczne formy drożdży, wśród nich *Torulopsis*, czerwone, białe i kremowe.

Tabela V

Bakterie wyizolowane z różnych warzyw

Бактерий выделенные из разных овощей

Types of bacteria isolated from the vegetables

Rodzaj bakterii	Sałata	Szpinak	Koper	Pietruszka	Kapusta
Escherichia coli	+	+	–	–	+
Aerobacter aerogenes	+	+	+	–	+
Intermedium i *paracoli*	+	+	+	+	+
Cl. botulinum typ A i B	+	–	–	–	–
Cl. welchii	+	–		–	+
Cl. sporogenes	+	+	–	–	+
Beztlenowe laseczki bliżej nieokreślone	+	+	+	–	+
Bacillus mesentericus	+	+	–	–	+
Bacillus subtilis	–	+	–	–	+
Pseudomonas liquefaciens	+	+	–	–	–
Serratia marcescens	+	–	–	–	+
Micrococcaceae	+	+	+	+	+
Bacteriaceae r. *Bacterium*	+	+	–	+	+
Bacillaceae r. *Bacillus*	+	+	+	+	+
Achromobacteriaceae	+	+	+	+	–
Drożdże	+	+	+	+	+
Pleśnie	+	+	–	–	–

Na szpinaku wykazano zbliżoną mikroflorę do sałaty z tą różnicą, że w żadnej próbie nie wykryto *Cl. botulinum* i *Cl. welchii*, natomiast stwierdzono występowanie *B. subtilis* i *B. mesentericus*. Ilościowo przeważały drobnoustroje gramujemne i pałeczki zarodnikujące z grupy *B. mesentericus*. Ziarniaki i drożdże reprezentowane były mniej licznie. Laseczki beztlenowe występowały w wielu próbach: na 10 posiewów szpinaku, w 7-miu stwierdzono ich obecność. Zanieczyszczenie bakteriami z grupy pałeczki okrężnicy było znaczne. Na 19 posiewów szpinaku, 9 dało wynik dodatni na obecność bakterii z grupy pałeczki okrężnicy. Przewagę ilościową stanowił typ *intermedium; E. coli* stwierdzono tylko w jednej próbie.

Na kapuście większą część mikroflory stanowiły ziarniaki. Spotkano jednak i szereg innych bakterii: *Serratia marcescens, B. mesentericus* i inne. Wyizolowano również laseczki beztlenowe, wśród nich *Cl. welchii*

i *Cl. sporogenes*. Wykazano dość znaczne zakażenie bakteriami z grupy pałeczki okrężnicy.

WPŁYW MYCIA NA ILOŚĆ DROBNOUSTROJÓW NA WARZYWACH

Jak widać z podanego zestawienia (Tab. II i III) warzywa mają na swojej powierzchni znaczne ilości różnego rodzaju drobnoustrojów, często nawet chorobotwórczych, które mogą być przyczyną wielu zachorowań.

Drobnoustroje mogą być usunięte z powierzchni warzywa przez dokładne i staranne ich mycie. Aby wykazać jaki wpływ na ilość bakterii ma mniej lub bardziej dokładne mycie warzyw, przeprowadzono następujące doświadczenia:

Myto warzywa: 1) wodą bieżącą pod kranem w ciągu kilkunastu sekund, nie wykonując przy tym żadnych dodatkowych czynności, 2) myto warzywa w misce kilka sekund określoną ilością wody, przewracając je przy pomocy szczypiec. Oczywiście żaden z tych dwóch sposobów mycia nie pozwalał na usunięcie znacznej ilości drobnoustrojów. W tym przypadku chodziło raczej o wykazanie różnicy w ilościach bakterii uzyskanej przy stosowaniu różnego rodzaju mycia.

Wyniki zestawiono w tabeli II i III. Przy zastosowaniu mycia pod kranem, ilość bakterii zmniejszyła się o przeszło 90%, jednak jeszcze część bakterii pozostawała na warzywie. Obliczono, że sałata myta zawierała w 1 g od kilkuset tysięcy do kilkudziesięciu milionów drobnoustrojów. Podobne wyniki otrzymano dla innych warzyw.

Przy myciu warzywa w misce (pobieżnie) pozostawało na warzywie do 40% drobnoustrojów. Przy myciu pod kranem — kilka procent, a więc ilość znacznie mniejsza.

WNIOSKI

1. Warzywa wykazują znaczne zanieczyszczenia drobnoustrojami.
2. Średnia ilość bakterii na jeden gram świeżego warzywa wynosi od kilku tysięcy do kilkudziesięciu milionów.
3. Z badanych warzyw największą ilość drobnoustrojów stwierdzono na sałacie.
4. Wśród bakterii izolowanych z warzyw, przewagę stanowią bakterie z grupy pałeczki okrężnicy (*Intermedium, Aerobacter aerogenes, Paracoli*) w nielicznych tylko przypadkach wykazano *E. coli*.
5. Wykazano także obecność licznych laseczek beztlenowych, wśród nich: *Cl. welchii, Cl. sporogenes*, a w dwóch przypadkach *Cl. botulinum* typ A i B.
6. Z mikroflory saprofitycznej tlenowej wyizolowano: *B. mesentericus, B. subtilis, Pseudomonas liquefaciens, Serratia marcescens*, bakterie z rodziny *Micrococcaceae, Bacillaceae, Achromabacteriaceae* jak również liczne gatunki drożdży i pleśni.
7. Mycie w wodzie bieżącej usuwa z warzyw 90% mikroorganizmów, lecz mimo to ilość drobnoustrojów pozostająca na warzywach jest dość znaczna.

8. Przy myciu warzywa na misce, w zwykle stosowany sposób, pozostaje na warzywie do 40% drobnoustrojów, przy myciu w wodzie bieżącej — kilka procent, a więc ilość znacznie mniejsza.

Г. Бужинска

МИКРОФЛОРА НЕКОТОРЫХ ОВОЩЕЙ ПРОДАВАЕМЫХ НА ВАРШАВСКИХ БАЗАРАХ

Резюме

Исследования проводились летом и осенью 1951 года. Метеорологические условия, господствующие в этом году не способствовали благополучному развитию микроорганизмов. Сильная инсоляция и продолжительная засуха были теми факторами, которые оказывали губительное или тормозящее влияние на развитие микроорганизмов на поверхности растений. Было совершено 98 посевов разных овощей: салата, петрушки, укропа, капусты, помидоров и шпината.

Обнаружено значительные количества микроорганизмов на отдельных видах овощей. Среднее число бактерий на 1 г овощей колебалось от нескольких тысяч до нескольких десятков миллионов. Больше всего загрязнен бактериями салат. Установлено, что промывание овощей водопроводной водой удаляет 90% микроорганизмов, но все-таки количество бактерий после промывки довольно значительно. На промытом салате оказалось еще от нескольких сотен тысяч до нескольких десятков миллионов бактерий.

При промывании овощей на миске, обычно применяемым образом, на овощах оставалось до 40% микроорганизмов, при промывании же водопроводной водой в среднем несколько процентов, следовательно значительно меньше. Ни в одном случае не обнаружено бактерий из рода *Salmonella* и *Shigelia*, а также стафилококков и гемолизирующих стрептококков.

Установлено сравнительно значительное загрязнение овощей бактериями из группы кишечной палочки (в 60% проб), среди которых преобладали: *Intermedium, Aerobacter aerogenes, Paracoli,* а лишь только в нескольких случаях были обнаружены типичные *Escherichia coli.*

Кроме того обнаружено сравнительно большое количество анаэробных палочек, часть которых автор пытался определить. Удалось точно определить лишь несколько штаммов *Cl. welchii* и *Cl. sporogenes*, а также *Cl. botulinum* типов A и B, оба штамма выделены из салата.

Из аэробной сапрофитической микрофлоры были выделены. *B. mesentericus, B. subtilis, Ps. liquefaciens, Serratia marcescens* бактерии из семейства *Micrococcaceae, Bacteriaceae, Bacillaceae, Achromobacteriaceae,* а также многочисленные виды дрожжей и плесневых грибков.

H. Burzyńska

THE MICROFLORA ON SOME VEGETABLE IN WARSAW MARKET

Summary

These studies were conducted in the summer and in the autumn 1951.

It was showed that the surface-microflora of examined vegetables (lettuce, parsley, fennel, cabbage, tomatos and spinage) was very abundant. Hundreds of thousands to many millions of bacteria were found per 1 g of vegetables weight. (Tables I and II).

The highest bacteria count was observed in the lettuce.

It was proved that washing of the vegetables in a dish with water removed ca 60% of bacteria. Washing in flowing water removed ca 90% of bacteria. (Tables III and IV).

Salmonellae, Shigella, Staphylococci and haemolytic streptococci were absent.

Bacteria of *coli- aerogenes* group were found relatively often (60% of samples).

Many anaerobic bacilli were isolated. Only few strains could be identified — *Clostridium botulinum* types *A* and *B* (from lettuce), *Cl. welchii* and *Cl. sporogenes.*

The aerobic saprophytic bacteria found on the examined vegetables are enumerated in the Table V.

LITERATURA

1. Baumgartner G. G., 1949: Canned Foods, Churchill, J, A., London.
2. Cruess K. V., 1948: Commercial Fruit and Vegetable Products, London.
3. Dack G. E., 1943: Food poisoning, Chicago and the Cambridge University Press, London.
4. Düggelli M., 1904: Die Bakterienflora gesunder Samen und daraus gezogener Keimpflänzchen, *Zentr. Bakt,* II, **12** : 602, **13** : 695.
5. Lewitt A. A., 1950: Srawnitielnaja sanitarnaja ocenka owoszczej wyraszczi-wajemych na poljach oroszajemych i na poljach nie oroszajemych stocznymi wodami, *Gigiena* i *Sanitaria,* z. 7 : 37.
6. Malewicz — wg Alejew B. C. i Czistiakow F. M., 1945, Mikrobiołogia konserwirowania, Moskwa.
7. Morzycki J., Kawecki Z. i Kornowicz W., 1951: Badania doświadczalne nad epidemiologiczną rolą jarzyn zielonych — zgłoszone na XI Zjazd T-wa Mikrobiol. Polskich, Kraków.
8. Mayer K. F., a. Dubovsky B. J., 1922: The Distribution of the Spores of *Bacillus botulinus* in California. The Distribution of the Spores of *Bacillus botulinus* in the Territory of Alaska and the Dominion of Canada. The Occurance of the Spores of *Bacillus botulinus* in Belgium, Demmark, England, *Journ.* of *Infectious Diseases,* **31** : 540.
9. Tanner F. W., 1944: The Microbiology of Foods, Illinois Press.
10. Topley a. Wilson, 1947: Principles of Bacteriology and Immunity, Arnold, London.

E. Czerwińska i *R. Kowalik*

DZIAŁANIE ETYLENOBISDWUTIOKARBAMINIANU DWUSODOWEGO (NABAMU) I ETYLENOBISDWUTIOKARBAMINIANU CYNKOWEGO (ZINEBU) NA KILKA GRZYBÓW NIEDOSKONAŁYCH ORAZ NA BAKTERIE WIĄŻĄCE AZOT ATMOSFERYCZNY

Z Zakładu Związków Toksycznych Instytutu Barwników i Półproduktów w Warszawie
Wpłynęło dnia 17.XI.1954

WSTĘP

Na własności grzybobójcze etylenobisdwutiokarbaminianu dwusodowego — nabamu *) (nazwa handlowa „Dithane") zwrócili uwagę jako pierwsi Dimmond, Heuberger i Horsfall (1943) oraz Horsfall (1945), a Mielnikow (1954) podaje, że sole kwasu etylenobisdwutiokarbaminowego służą do zaprawiania nasion.

Nabam jest rozpuszczalny w wodzie (w przeciwieństwie do innych karbaminianów), w cienkich warstewkach na powierzchni rośliny staje się jednak nierozpuszczalny (Frear, 1948). Zjawisko to może być spowodowane przez chemiczne przemiany jakim ulega związek w tych warunkach. Campbell (1948) oraz Heuberger i Manns (1944) stwierdzili, że dodanie siarczanu cynkowego oraz wapna do nabamu wyraźnie zwiększa jego wartość jako środka grzybobójczego.

Ostatnio otrzymano etylenobisdwutiokarbaminian cynkowy — zineb *).

Kampmeier i Haag (1954) podają, że nabam i zineb nie powodują wyraźnych zatruć u ludzi. Jednak według nich nabam może powodować uczulenia i dlatego należy unikać jego wchłaniania i zanieczyszczenia skóry i oczu. Zineb natomiast gromadzi się na roślinach uprawnych po opryskach i opylaniu w stężeniu od 0 —13 części na milion, a już jedna część na milion występująca w diecie ludzkiej mogłaby mieć ujemny wpływ na konsumenta. Löwen (1951) jednak na podstawie przeprowadzonych badań analitycznych stwierdza, że dwutiokarbaminiany nie gromadzą się na powierzchni roślin, a ilość ich wyraźnie zmniejsza się po kilku dniach wskutek wypłukiwania.

*) Nazwa znormalizowana, zaproponowana dla tego związku przez British Standarts Institution (B. S. 1831, Part 1, 1952).

Chester (1948), Fabre i in. (1949) zalecają stosowanie nabamu do opryskiwania jabłoni, gruszy, czereśni, brzoskwini i orzecha włoskiego przeciwko chorobom. Według Hamiltona (1948) środek ten łącznie z mleczanem fenylo-rtęcio-trójetanolo-amonowym i glioksalidyną zapobiega parchowi jabłoni (*Venturia inaequalis*). Feekes (1949) określił w warunkach laboratoryjnych przy użyciu 10 gatunków grzybów niedoskonałych dawki grzybobójcze nabamu. Stężenia te wahały się od 0,001 — 0,0001%. „Dithane Z-78" w stężeniu 0,2% zastosowany do opryskiwania przy 10% kwitnieniu drzew a potem przy pełnym kwitnieniu zmniejszał występowanie choroby jabłoni i grusz o 75% (Thomas, Henderson, 1952). Używano go również do zwalczania zakażeń powodujących gnicie czereśni. Związek ten był tak samo skuteczny, jak ciecz bordoska i dwumetylodwutiokarbaminian żelaza — ferbam (Swartwout, 1947).

Zineb, stosowany do opryskiwania drzew owocowych w różnych rejonach Włoch w latach 1949 — 1953, dał również dobre wyniki. Zaletami tego związku są: skuteczność działania w pospolitych chorobach grzybowych oraz brak ujemnego wpływu na rośliny (Ciferri 1954). W Chile używany był z powodzeniem do zwalczania raka jabłoni (Vergara, 1945). W zwalczaniu chorób zbóż okazał się skuteczniejszy, niż ciecz siarkowo-wapienna (Hashioka i Morihashi, 1954, Baldacci i inni, 1952).

Nabam i zineb zwalczają choroby fasoli, kapusty, selera, ogórka, ziemniaka i pomidora (Chester, 1948). Eddins (1950) stosował nabam z siarczanem cynku (2 kg: 1 kg: 500 litrów wody) w przypadku chorób kapusty i kalafiora, wywoływanych przez *Perenospora parasitica*. Opryskiwania nabamem z siarczanem cynku i wapnem oraz samym zinebem działaby skutecznie przeciwko chorobom pomidorów spowodowanym przez *Alternaria, Phytophthora infestans* i *Stemphylium solani* (Borders, Huey 1951, Tisdale i Flenner, 1951). Według Ciccarone (1951) 65% zineb („parzate") w rozcieńczeniu 0,2% nie nadaje się do zwalczania *Cladosporium fulvum* na pomidorach. W tym przypadku lepsze wyniki dawał dwumetylodwutiokarbaminan żelazowy — ferbam, przy czym nie uszkadzał roślin. Przy zwalczaniu *Phytophthora infestans* dość dobre rezultaty otrzymano używając zinebu z 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonem. Newhall i Willson (1948) stwierdzili wyraźne działanie grzybobójcze (niewiele słabsze od działania cieczy bordoskiej, dwumetylodwutiokarbaminianu cynkowego — ziramu i 2,3-dwuchloro-1,4-naftochinonu), stosując sól kwasu etylenobidwutiokarbaminianu do zwalczania chorób cebuli i selera.

Hildebrand, Mc Keen i Koch (1949) próbowali zapobiegać gniciu buraka cukrowego, spowodowanemu przez kilka grzybów glebowych, wprowadzając do gleby obok innych substancji również nabam i zineb. Emge i Linn (1950) wykazują w swej pracy, że zineb zwiększa w warunkach polowych plon ziemniaków, pomidorów, melonów i ogórków. Autorzy cytują pracę Horsfalla i Turnera, według których plon ziemniaków opryskiwanych mieszaniną nabamu, siarczanu cynku i wapna był większy niż roślin opryskiwanych cieczą

bordoską. Nabam i zineb można stosować przeciwko chorobom roślin ozdobnych: goździka i róży Chester (1948), Tisdale i Flenner (1951), Westcott (1950).

Dobre wyniki uzyskano również przy zwalczaniu chorób pieczarek wywołanych przez *Mycogone perniciosa*. Pieczarki nie tworzą enzymów uwalniających z dwutiokarbaminianów związki toksyczne siarki i dlatego są odporne na te środki grzybobójcze. Najlepsze wyniki dawał pył zawierający 15% zinebu (Zibimate).

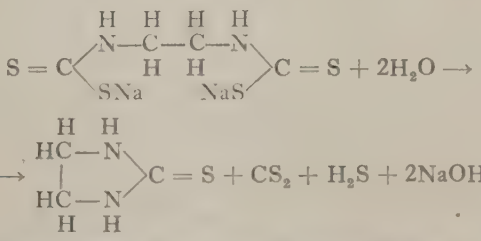
Klingman i Rosenzweig (1952) zalecają stosowanie nabamu do zwalczania mykoz u ludzi. W odróżnieniu od naftochinonów związek ten nie ulega inaktywacji w obecności krwi. Chester (1948) wspomina również o działaniu odstraszającym nabamu na owady. Nabam można stosować łącznie z DDT i parathionem (Newhall i Wilson, 1948, Newhall, Rawlins, 1952). Hallecki i Cochrane (1950) stwierdzają, że stosowanie zinebu do zwalczania chorób fasoli zmniejsza ilość bakterii w strefie korzeniowej.

Parker-Rhodes (1943) jako pierwszy wysunął pogląd, że pod wpływem działania kwaśnych wydzielin zarodników grzybów na dwutiokarbaminian powstaje dwusiarczek węgla, który miałby być tutaj najbardziej czynnym składnikiem grzybobójczym. Reakcja w wyniku której powstaje CS_2 przebiega następująco:

$$S=C\begin{matrix}NR_2\\SNa\end{matrix} + H_2O \longrightarrow NHR_2 + CS_2 + NaOH$$

Amina i zasady są następnie zobojętniane przez obecny w środowisku kwas. Później Barratt i Horsfall (1947) oraz Davies i Sexton (1946) wskazali jednak na względnie niską toksyczność CS_2 i amin. Jednocześnie zwrócili uwagę na H_2S tworzący nierozpuszczalne sole z metalami niezbędnymi dla metabolizmu pleśni.

Rich i Horsfall (1950) stwierdzili, że z nabamu tworzy się poza H_2S inny gazowy związek grzybobójczy. Lopatecki i Newton (1952 a, b) starali się zidentyfikować lotne produkty rozkładu nabamu. Według nich nabam rozkłada się w obecności słabego kwasu według reakcji:



W środowisku zasadowym siarkowodór, powstały przy rozkładzie nabamu, tworzy pod wpływem wodorotlenku sodu siarczek sodu:

$$H_2S + 2NaOH \rightarrow Na_2S + 2\,H_2O$$

Przy pomocy tlenu atmosferycznego siarczek sodu utlenia się do siarczanu:

$$Na_2S + 2\,O_2 \rightarrow Na_2SO_4$$

Stoddard (1951) i Ellis (1950) oraz Thomas (1950) sądzą, że nabam i zineb mogą działać jako środki chemoterapeutyczne przy zwalczaniu chorób roślin. Ponieważ sam nabam jest związkiem nietrwałym, nie może przenikać do wnętrza rośliny. Zatem działanie to tłumaczyć należy aktywnością jednego lub większej ilości produktów jego rozkładu.

Sisler i Cox (wg Cox, Sisler i Spurr, 1951), oraz Cox, Sisler i Spurr (1951) wykazali, że lotnym środkiem grzybobójczym, powstającym z nabanu jest CS_2. Obecność CS_2 wykryli dwiema metodami:

a. Metodą Vogla, w której CS_2 zbiera się w alkoholu absolutnym o odczynie zasadowym, zakwasza kwasem octowym i traktuje rozcieńczonym $CuSO_4$ celem otrzymania żółtego osadu ksantogenianu miedziowego.

b. Metodą Vilesa, w której wydzielony gaz wprowadza się do etanolowego roztworu trójetanoloaminy, dwuetyloaminy i octanu miedziowego, przy czym powstaje dwumetylodwutiokarbaminian miedziowy, zabarwiony na kolor żółto-brązowy. W atmosferze nie stwierdzono innych lotnych produktów rozkładu poza CS_2.

Cox i inni umieszczali krople zawiesiny zarodników *Colletotrichum* i *Fusarium* na szkiełku przedmiotowym nad dwusiarczkiem czterometylotiuramu, nad wodą z CS_2 i nad samą wodą. Stwierdzili przy tym, że zarodniki *Colletotrichum* i *Fusarium* nie wykiełkowały w ogóle nad związkiem karbaminowym o stężeniu 10 g na 1 litr, a tylko niewiele z nich wykiełkowało przy stężeniu 1 g na 1 litr. Wyniki tych doświadczeń prowadzą do wniosku, że gazowymi substancjami trującymi pochodnymi kwasu dwutiokarbaminowego są prawdopodobnie CS_2 i aminy. Powstawanie CS_2 podczas rozkładu nabamu i ferbamu stwierdzono przy pomocy metody chromatograficznej. Ilość wydzielającego się CS_2 zwiększała się przy obniżeniu pH poniżej 7. Rozkład nabamu był hamowany przez utleniony glutation. Związek ten w przeciwieństwie do ferbamu nie wpływał hamująco na ureazę. Ludwig i Thorn (1953) stwierdzili rozpad wodnego roztworu nabamu na etylenotiomocznik, siarczek etylenotiuramu i elementarną siarkę. Uważają oni za prawdopodobne powstawanie również siarczku polietylenotiuramu. Mieszanina tych związków powstałych z rozpadu nabamu miała własności silnie grzybobójcze. W dalszej pracy Ludwig, Thorn i Miller (1954) przypuszczają, że własności grzybobójcze nabamu wywołane są zarówno mono- jak i polimerem siarczku czteroetylenotiuramu, powstałymi z rozpadu nabamu. Zineb użyty w postaci zawiesiny w wodzie destylowanej posiadał słabe własności grzybobójcze i nie przechodził w siarczek czteroetylenotiuramu. Pod wpływem alkalii zwiększała się rozpuszczalność zinebu w wodzie, powstawał siarczek czteroetylenotiuramu oraz zwiększała się aktywność grzybobójcza (Ludwig, Thorn, 1954).

Van Raalte (1953) podaje, że grzybobójcze działanie nabamu na *Fusarium coeruleum* podlegało zahamowaniu przez dodanie do po-

dłoża $CuSO_4$. Maksymalne zahamowanie działania grzybobójczego zanotowano przy stosunku 1 mol $CuSO_4$ na 2 mole karbaminianu. Pod wpływem nabamu następowało odbarwienie konidii grzyba tak samo jak przy braku miedzi w podłożu. Autor wnioskuje, że działanie grzybobójcze nabamu polega prawdopodobnie na łączeniu się tego związku z miedzią, występującą w komórkach grzyba. Powoduje to modyfikację procesów katalitycznych odbywających się w komórce. Bliższych wyjaśnień autor nie podaje.

Klöpping i Van der Kerk (1951), Van der Kerk i Klöpping (1952) oraz Sijpesteijn, Van der Kerk (1952) stwierdzili, że w przeciwieństwie do dwusiarczku czterometylotiuramu i dwutiokarbaminianów etylenobisdwutiokarbaminiany nie wykazują „odwracalności biologicznego działania". Terminem tym określa się zjawisko występujące przy działaniu dwutiokarbaminianów na grzyby. Zjawisko to polega na tym, że przy zwiększeniu stężenia tych związków powyżej wartości hamującej całkowicie wzrost grzyba następuje spadek działania hamującego, a następnie jego wzrost aż do powtórnego całkowitego zahamowania, które utrzymuje się przy dalszym zwiększaniu stężeń.

U bisdwutiokarbaminianów nie zachodzi również inaktywacja działania przeciwgrzybowego przez l-histydynę w przeciwieństwie do dwutiokarbaminianów. Według wyżej wymienionych autorów działanie grzybobójcze dwutiokarbaminianów w dawkach powyżej stężenia przy którym zachodzi zjawisko odwracalności może polegać na wpływie tego związku na syntezę lub metabolizm l-histydyny. Stwierdzono bowiem, że dodanie do podłoża l-histydyny obniża moc grzybobójczą karbaminianów. Zjawiska tego nie stwierdzono w przypadku użycia bisdwutiokarbaminianów. Na tej podstawie autorzy wnioskują, że mechanizm działania grzybobójczego bisdwutiokarbaminianów jest inny od mechanizmu działania dwutiokarbaminianów.

BADANIA WŁASNE

Własności grzybobójcze soli sodowej i cynkowej kwasu etylenobisdwutiokarbaminowego, syntezowanych przez mgr S. Mosińskiego w Zakładzie Związków Toksycznych Instytutu Barwików i Półproduktów, przebadano metodą opisaną w pracy Kowalika (1951) na następujących grzybach: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia*, *Cladosporium*, *Fusarium* i *Alternaria*, przy użyciu stężeń 2 milimoli, 0,2 milimola i 0,02 milimola. Zbadano także wpływ soli sodowej na *Rhizobium leguminosarum*, *R. ornithopi*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii* i *R. lupini* oraz *Azotobacter*, a soli cynkowej na *R. phaseoli*, *R. trifolii*, *R. ornithopi*, *R. leguminosarum* i *Azotobacter* przy użyciu stężeń 2 milimole, 1 milimol i 0,5 milimola.

Badanie wykonano metodą podaną przez Ruhloffa i Burtona (1951) zmodyfikowaną przez A. Odrzywolską (praca nieopublikowana).

Na szalki Petriego z pożywką agarową Ashby'ego wysiewano po 3 mililitry zawiesiny bakteryjnej, otrzymanej przez spłukiwanie bakterii wyhodowanych w probówkach na tej samej pożywce. Nadmiar płynu ściągano pipetą.

Dla *Rhizobium lupini* używano pożywki o pH 6,5, dla pozostałych zaś drobnoustrojów o pH 7,0. pH pożywki nastawiano przed wyjaławianiem, które przeprowadzano w parze bieżącej w przeciągu 3 kolejnych dni co 24 godziny. Następnie krążki bibuły o średnicy 1,8 cm, nasycone w przeciągu 1 minuty odpowiednim stężeniem badanego związku i wysuszone aż do zupełnego wyparowania rozpuszczalnika (acetonu lub wody) układano na powierzchni pożywki, na którą uprzednio zasiano już bakterie.

Jako rozpuszczalnika dla soli sodowej użyto wody, a dla soli cynkowej acetonu. Dla kontroli nastawiano hodowle z krążkami bibuły nasyconymi samym rozpuszczalnikiem. Hodowle trzymano w termostacie w temperaturze 30°. Wyniki odczytywano począwszy od 48 godzin od nastawienia doświadczenia w ciągu 10 dni co 24 godziny, mierząc strefy zahamowania.

WYNIKI BADAŃ

Własności grzybobójcze związków użytych do doświadczeń podano w tabeli I i na załączonych zdjęciach (Fot. 1, 2 i 3). Jak widać z tabeli I, sól sodowa posiada silniejsze własności grzybobójcze niż sól cynkowa. Dawką hamującą wzrost wszystkich grzybów oprócz *Alternaria* było stężenie 0,2 milimola soli sodowej, natomiast sól cynkowa hamowała wzrost *Penicillium, Alternaria, Rhizoctonia* dopiero w stężeniu 2 milimoli.

Tabela I

Stężenia w milimolach etylenobisdwutiokarbaminianu hamujące całkowicie wzrost grzybów

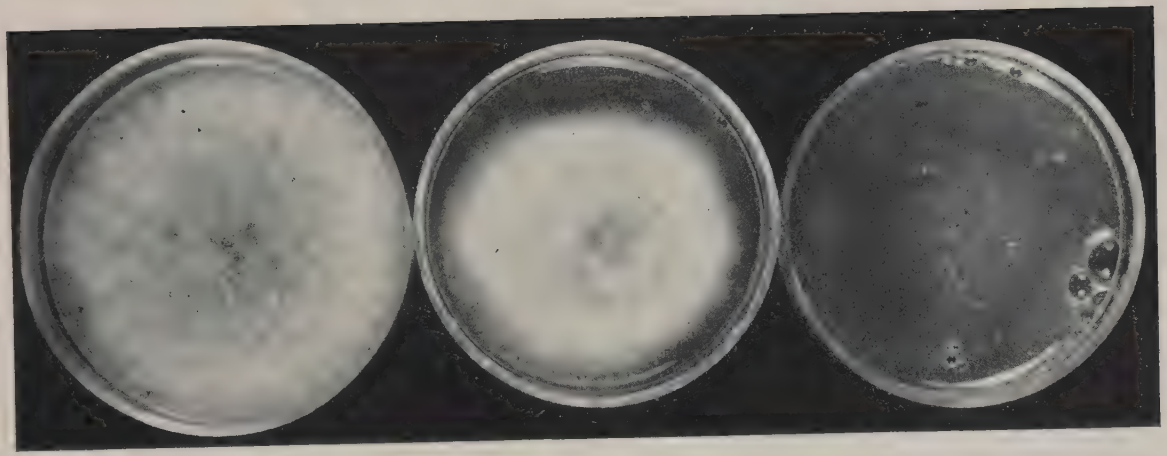
Концентрация в милимолях этиленбисдитиокарбамината, задержающая полностью рост грибов

Fungistatic action of ethylenbisdithiocarbamates (concentrations in mM)

Środek grzybobójczy	*Aspergillus*	*Fusarium*	*Penicillium*	*Colletotrichum*	*Alternaria*	*Rhizoctonia*
sól Zn	0,2	0,2	2	0,2	2	2
sól Na	0,2	0,2	0,2	0,2	2	0,2

Tabele II i III ilustrują działanie nabamu i zinebu na *Rhizobium* i *Azotobacter*.

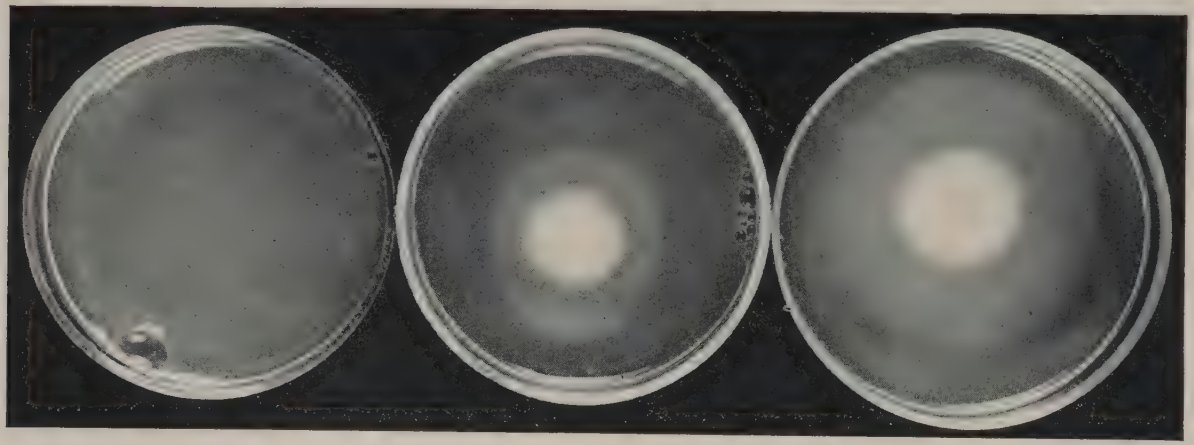
U *Azotobacter* wokół krążków nasyconych zinebem obserwowano 2 strefy: a. Strefę intensywnego wzrostu przy samym krążku, obfitszego niż na płytkach kontrolnych i b. strefę następną, wykazującą częściowe zahamowanie wzrostu. Za strefą lekkiego zahamowania uważano normalny wzrost jak na płytce kontrolnej, (słabszy niż w strefie a, silniejszy niż w strefie b). Stwierdzono, że zineb jest bardziej toksyczny niż nabam w stosunku do bakterii wiążących azot. Zgadzałoby się to z danymi Ruhloffa i Burtona (1951), według których, związki organiczne zawierające metale ciężkie, a więc i zineb, są trujące dla *Rhizobium*.



Fot. 1. Grzybobójcze działanie zinebu na wzrost *Fusarium sp. 1.* Kontrola; 2. 0,02 milimola zinebu; 3. 0,2 milimola zinebu

Фот. 1 Грибогубительные действие зинеба на рост *Fusarium sp.*

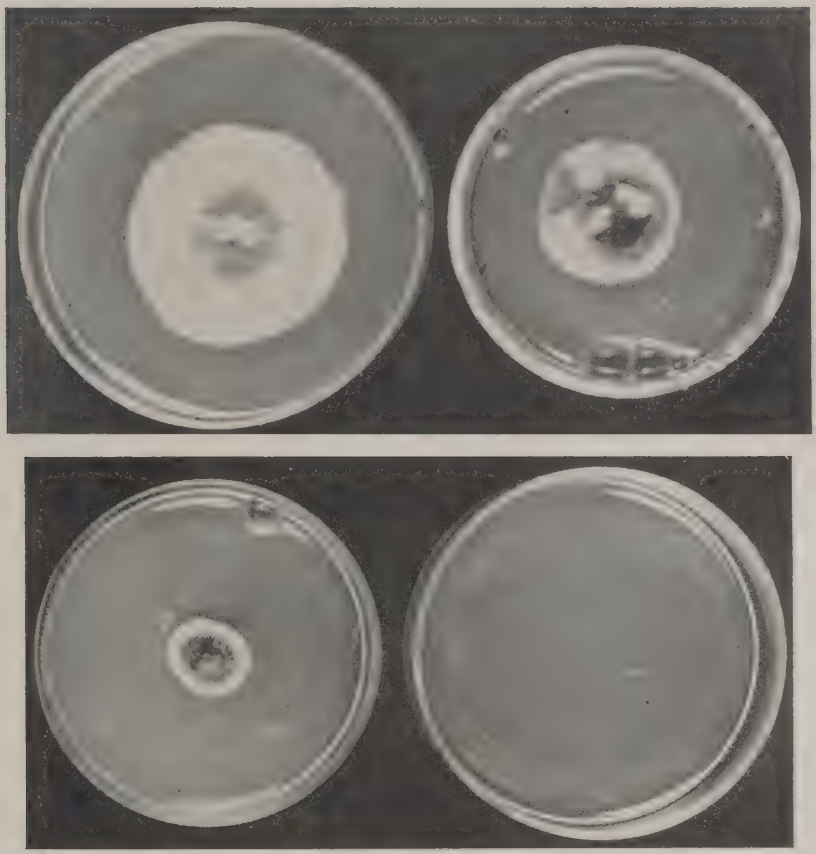
Phot. 1. Fungistatic action of Zineb on *Fusarium sp.*



Fot. 2. Grzybobójcze działanie zinebu na wzrost *Aspergillus*. 1. Kontrola; 2. 0,02 milimola zinebu; 3. 0,2 milimola zinebu

Фот. 2. Грибогубительные действие зинеба на рост *Aspergillus*

Phot. 2. Fungistatic action of Zineb an *Aspergillus*.



Fot. 3. Grzybobójcze działanie zinebu na wzrost *Alternaria*. 1. Kontrola; 2. 0,02 milimola zinebu; 3. 0,2 milimola zinebu; 4. 2 milimole zinebu.

Фот. 3 Грибогубительные действие зинеба на рост *Alternaria*

Phot. 3. Fungastic action of Zineb on *Alternaria*

Tabela II

Strefy zahamowania (w milimetrach) *Rhizobium* i *Azotobacter* wywołane przez nabam
Зоны торможения (в милиметрах) роста *Rhizobium* и *Azotobacter* вызванные набамом
The diameter of Nabam inhibition-zones (mm) for *Rhizobium* and *Azotobacter*

Stężenie	2 milimole		1 milimol		0,5 milimola	
Długotrwałość wzrostu (dni)	5 dni	10 dni	5 dni	10 dni	5 dni	10 dni
Szczep						
R. phaseoli	—	—	—	—	—	—
R. trifolii	5,7	5,7	2	1,2	2	2
R. ornithopi	—	—	—	—	—	—
R. meliloti	—	—	—	—	—	—
R. lupini	—	—	—	—	—	—
R. leguminosarum	—	—	—	—	—	—
Azotobacter	4,3	—	—	—	—	—

Tabela III

Strefy zahamowania wzrostu w milimetrach (I- całkowitego, II- częściowego) przy użyciu zinebu
Зоны торможения (в милиметрах) роста бактерии клубенковых зинебом
The Zineb inhibition zones in *Rhizobium* cultures (I- complete inhibition, II- partly inhibition)

Stężenie	2 milimole				1 milimol				0,5 milimola			
Długotrwałość wzrostu (dni)	5 dni		10 dni		5 dni		10 dni		5 dni		10 dni	
Strefy zahamowania	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Szczep												
R. phaseoli	4,5	—	4,5	—	2	—	2	—	0,7	—	0,7	—
R. trifolii	—	3,5	—	3	—	2,5	—	2,5	—	1,5	—	1,0
R. ornithopi	4	—	4	—	3,2	—	2,9	—	2,2	—	1,6	—
R. leguminosarum	7	—	7	—	4	—	4	—	—	—	—	—

WNIOSKI

1. Stężenie 2 milimoli etylenobisdwutiokarbaminianu cynku — zinebu jest dawką hamującą wzrost *Penicillium, Alternaria* i *Rhizoctonia*, natomiast 0,2 milimola hamuje wzrost *Aspergillus, Fusarium* i *Colletotrichum.*

2. Sól cynkowa-zineb działa hamująco na wzrost *Rhizobium phaseoli, Rh. ornithopi, Rh. trifolii* i *Azotobacter* w stężeniach 0,5 1 i 2 milimoli, 1 i 2 milimole są stężeniami trującymi dla *Rhizobium leguminosarum.*

3. Stężenie 0,2 milimola nabamu jest dawką zabójczą dla badanych grzybów z wyjątkiem *Alternaria* dla której dawką hamującą całkowicie wzrost jest stężenie 2 milimoli.

4. Nabam działa hamująco tylko na wzrost *Rhizobium trifolii* przy stężeniu 0,5, 1 i 2 milimoli oraz na *Azotobacter* w początkowym okresie przy stężeniu 2 milimoli.

Е. Червинска и Р. Ковалик

ДЕЙСТВИЕ ДВУНАТРИЕВОЙ СОЛИ ЭТИЛЕНОБИСДВУТИОКАРБАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ (НАБАМА) И ЭТИЛЕНОБИСДВУТИОКАРБАМИНАТА ЦИНКА (ЗИНЕБА) НА НЕСКОЛЬКО НЕСОВЕРШЕННЫХ ГРИБОВ, А ТАКЖЕ НА БАКТЕРИИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ АТМОСФЕРНЫЙ АЗОТ

Резюме

1) Этиленобисдвутиокарбаминат цинка (зинеб) при концентрации 2 милимоля задерживает рост *Penicillium*, *Alternaria* и *Rhizoctonia*, а при концентрации 0,2 милимоля задерживает рост *Aspergillus*, *Fusarium* и *Colletotrichum*.

2) Соль цинка — зинеб тормозит рост *Rhizobium phaseoli*, *Rh. ornithopi*, *Rh. trifolii* и *Azotobacter* при концентрациях 0,5, 1 и 2 милимоля.

3) Концентрация 0,2 милимоля набама является губительной дозой для исследуемых грибов, за исключением гриба *Alternaria*, для которого дозой задерживающей рост полностью является концентрация 2 милимоля.

4) Набам задерживает лишь рост *Rhizobium trifolii* при концентрациях 0.5, 1 и 2 милимоля, а также рост *Azotobacter* в начальный период, при концентрации 2 милимоля.

E. Czerwińska and *R. Kowalik*

THE INFLUENCE OF ETHYLENEBISDITHIOCARBAMATES („ZINEB" AND „NABAM") ON SOME *FUNGI IMPERFECTI* AND ON NITROGEN- FIXING BACTERIA.

Summary

Zineb in concentration 2 mM inhibited completely the growth of *Penicillium*, *Alternaria* and *Rhizoctonia*.

Aspergillus, *Fusarium* and *Colletotrichum* were inhibited in the presence of Zineb in 0,2 mM concentration.

Zineb in concentration 0,5, 1 and 2 mM was also toxic for *Rhizobium phaseoli*, *Rh. ornithopi*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum* and for *Azotobacter*.

Fungicidal action of Nabam was more pronounced. It was active even in concentration not higher than 0,2 mM against all tested fungi, except *Alternaria* which was inhibited by 2 mM.

On the other hand, Nabam was shown to be relatively less toxic for bacteria. The inhibition of *Rh. trifolii* was observed in concentrations above 0,5 mM. The growth of *Azotobacter* was influenced in the early period of incubation only by the highest клеточными оболочкными (рис. 1 и 2).

LITERATURA

1. Baldacci E., Scotti T., Thalmann L., 1952: Blight in rice seeds., *Chem. Abstr.*, **46** : 5243.
2. Barratt R. W., Horsfall J. G., 1947: Fungicidal action of metallic alkyl bisdithiocarbamates., *Conn. Agr. Expt. Sta. Bull.*, 508.
3. Borders Huey, 1951: Test of the fungicides for the control of tomato plant diseases in South Georgia., *Chem. Abstr.*, **45** : 5352.
4. Campbell J. C., 1948: Promising new chemicals for control of disease and insects., *Amer. Potato P.*, **25** : 82.
5. Chester K. S., 1948: Nature and prevention of plant diseases. The Blakinston Co. Philadelphia.
6. Ciccarone A., 1951: Control of *Cladosporium fulvum.*, *Chem. Abstr.*, **45** : 8695.
7. Ciferri R., 1954: Cinque anni di esperienzo con anticrittogamici a base di etilenbisditiocarbamato di zinco., *Rev. App. Mycol.*, **33**:436.
8. Cox C. E., Sisler H. D., Spurr R. A., 1951: Identity of gazeous toxicants from organic sulfur fungicides., *Science*, **114** : 643.
9. Davies W. H., Sexton W. A., 1946: Chemical constitution and fungistatic action of organic sulfur compounds., *Bioch. J.*, **40** : 331.
10. Dimmond A. E., Heuberger J. W., Horsfall J. G., 1943: A water soluble protectant fungicide with tenacicy., *Phytopathology*, **33** : 1095.
11. Eddins A. H., 1950: Annual report of the Agr. Expt. Sta. Florida, 263.
12. Emge R. G., Linn M. B., 1950: The effect of zinc ethylene bisdithiocarbamate on the growth responses of the tomato plant., *Phytopathology*, **40** : 8.
13. Fabre R., Raoul Y., Desrue A., 1949: Manuel de phytopharmacie, t. III. Masson et Cie, Paris.
14. Feekes, 1949: Onderzoekingen over Schimmelbestrijdingsmiddelen. I. Sporekiemingsproeven met dithiocarbamaten., *Biol. Abstr.*, **24** : 10702.
15. Frear D., 1948: The chemistry of insecticides, fungicides and herbicides., D. van Nostrand Co., New York.
16. Haasis F. A., Ellis D. E., 1950: Effect of fungicidal drenches on incidence of lettuce downy mildew in the seed bed., *Plant Dis. Reptr.*, **34** : 310.
17. Halleck F. E., Cochrane V. W., 1950: Effect of fungistatic agents on the bacterial flora of the rhizosphera., *Phytopathology*, **40** : 715.
18. Hamilton J. M., 1948: Evaluation of organic fungicides for control of *Venturia inaequalis.*, *Phytopathology*, **38** : 313.
19. Hashioka Y., Morihashi T., 1954: Application of Dithane Z-78 to the rusts and powdery mildew of cereals., *Rev. App. Mycol.*, **33** : 287.
20. Heuberger J. W., Manns T. F., 1944: The use of zinc sulfate lime as a supplementary materials to improve the protective values of organic and inorganic copper fungicides against early blight of potatoes., *Del. Agr. Expt.* Sta., 10.
21. Hildebrand W. F., Mc Keen R. H., Koch E. F., 1949: Row treatment of soil with tetramethylthiuram disulfide for control of blackroot of sugarbeet seedling., *Can. J. Research*, **27** C : 23.
22. Horsfall J. G., 1945: Fungicides and their action. Chronica Botanica, Waltham, Massachusetts.
23. Kampmeier C., Haag H. B., 1954: Toxicological considerations in use of dithiocarbamates., *Agric. Chemicals*, **9** : 49.

24. Klingman A. M., Rosenzweig W., 1952: New fungistatic agents. I. For the treatment of superficial mycose., *Chem. Abstr.*, **46** : 675.
25. Klöpping H. L., Van der Kerk J. M. 1951: Organic fungicides. IV. Chemical constitution and fungistatic activity of dithiocarbamates., *Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas*, **70** : 917.
26. Kowalik R., 1951: Antybiotyczne działanie 2-podstawionych 1,4-naftochinonów na niektóre grzyby niższe i efekty grzybobójcze niektórych pochodnych kwasu dwutiokarbaminowego. *Prace Głównego Instytutu Chemii Przemysłowej*, **2** : 51.
27. Löwen W. K., 1951: Determination of dithiocarbamate residues on food crops., *Anal. Chem*, **23** : 1846.
28. Lopatecki L. E., Newton W., 1952 a: The decomposition of dithiocarbamate fungicides with special reference to the volatile products., *Can. J. Bot.*, **30** : 131.
29. Lopatecki L. W., Newton W., 1952 b: The chelates and their metal combination as fungicides., *Canad. Phytopath. Soc.*, **19** : 17.
30. Ludwig R. A., Thorn G. D., 1953: The breakdown of disodium etylenbisdithiocarbamate-Nabam., *Plant. Dis. Repr.*, **37** : 127.
31. Ludwig R. A., Thorn G. D., 1954: Fungicide action, seed treatments, resistance discussed at Phytopath. Meet. in Colorado., *Agric. Chemicals* **9** : 104.
32. Ludwig R. A., Thorn G. D., Miller D. M., 1954: The mechanism of fungicidal action of disodium ethylene bisdithiocarbamate (nabam)., *Canad. J. Bot,*. **32** : 48.
33. Mielnikow N. N., 1954: Primienienije produktow promyszlennosti organiczeskawo sintieza w sielskom chazjajstwie., *Żurnał Prikł. Chimii*, **27** : 577.
34. Parker-Rhodes A. F., 1943: Studies in the mechanism of fungicidal action. V. Non metallic and sodium dithiocarbamic acid derivatives., *Ann. App. Biol.*, **30** : 170.
35. Newhall A. G., Wilson J. D., 1948: Summary of data on cooperative fungicide tests on onions, carrots and celery in 1947., *Chem. Abstr.*, **42** : 5152.
36. Newhall A. G., Rawlins W. A., 1952: Control of onion blast and mildew with carbamates., *Phytopathology*, **42** : 212.
37. Rich S., Horsfall J. G., 1950: Gazeous toxicants from organic sulphur compounds., *Amer. J. Bot.*, **37** : 643.
38. Ruhloff M., Burton J. C., 1951: Compatibility of Rhizobia with seed protectants., *Soil Sci.*, **72** : 283.
39. Sijpessteijn A. K., Van der Kerk G. J. M., 1952: Investigations on organic fungicides. VI. Histidin as an antagonist of tetramethylthiuram disulfide and related compounds., *Ant. van Leeuwenhoeck J. Microbiol. Serol.*, **18** : 2.
40. Stoddard E. M. A., 1951: A chemotherapeutic control of strawberry red stele., *Phytopathology*, **41** : 34.
41. Swartwout H. G., 1947: Arsenical injury and some new fungicides., *Chem. Abstr.*, **41**: 4605.
42. Thomas W. D., 1950: New shade tree diseases in Colorado., *Plant Dis. Reptr.* **34** : 83.
43. Thomas W. D., Henderson W. J., 1952: Spray experiments for the control of fire bligt on apples and pears., *Plant Dis. Reptr.*, **36** : 273.

44. Tisdale W. H., Flenner A. L., 1951: Derivatives of dithiocarbamic acid as fungicides., *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **16** : 303.
45. Van der Kerk G. J. W., Klöpping H., 1952: Investigations of organic fungicides. VII. Further considerations regarding the relations between chemical structure and antifungal action of dithiocarbamate and bisdithiocarbamate derivatives., *Rec. Trav. Chim. des Pays-Bas*, **71** : 1179.
46. Van Raalte M. H., 1953: Het effect van metaal-ionen op de fungistatische werking van natrium dimethyl dithiocarbamaat. *Rev. App. Mycol.*, **32** : 201.
47. Vergara Castillo C., 1954: Un aporte al estudio de campo y de laboratorio del hongo *Nectria galligena.*, *Bras. Rev. App. Mycol.*, **33** : 303.
48. Weed R. M., Mc Callan S. E. A., Miller L. P., 1953: Factors associated with the fungitoxicity of ferbam and nabam.
49. Westcott C., 1950: Plant Disease Handbook. D. Van Nostrand Co., New York.

A. Golenia

PRZETRWALNIKOWE STADIUM PLEŚNI SZAREJ (*BOTRYTIS CINEREA* PERSOON) NA RĄCZNIKU.

Z Państwowego Instytutu Naukowego Leczniczych Surowców Roślinnych w Poznaniu.
Wpłynęło dnia 10.XI.1954

Przedmiotem badań było przetrwalnikowe stadium pleśni szarej (*Botrytis cinerea* Pers.), pasożytującej na rączniku (Kaznowski 1950 Naumow 1952). Materiał pochodził z *Ricinus communis* L. *ssp. chinensis (wg* Kaznowskiego 1950) odmiany Plewiskiej prof. Strażewicza, uprawianej w Ośrodku Doświadczalnym Państwowego Instytutu Naukowego Leczniczych Surowców Roślinnych w Plewiskach pod Poznaniem.

Pojawienie się przetrwalników (*sclerotia*) pleśni szarej na organach rącznika obserwowano w późnym okresie występowania choroby (w miesiącach wrześniu, październiku i listopadzie 1952, 1953 i 1954 roku).

Sklerocja powstawały na częściach roślin, wykazujących już wcześniejsze uszkodzenia przez pleśń szarą i pokrytych często konidialnym owocowaniem grzyba. Obserwowano je głównie na łupinie nasion rącznika oraz pędach rośliny, przeważnie na osi owocostanu i szypułkach owocowych (Fot. 1 i 2).

Znajdowane na rączniku przetrwalniki wykazują dużą zmienność wymiarów i kształtów. Największa ich średnica na nasionach wynosiła w naszym wypadku 0,5 — 5 mm, grubość wahała się w granicach 0,5 — 1 mm. Były one często prawie okrągłe, niekiedy wydłużone lub wieloboczne. Sklerocja grzyba na łodygach roślin bywają większe (do kilkunastu a nawet 20 mm) i są zazwyczaj wydłużone w kierunku długości pędu. Powstają one zwykle pod skórką. Obserwowano również przetrwalniki grzyba na szyi korzeniowej roślin, a niekiedy nawet na korzeniach (do głębokości 11 cm pod powierzchnią ziemi). Przetrwalniki bywają czarno, brunatnawo lub wyjątkowo białawo zabarwione; na nasionach otacza je często obwódka białawej grzybni. Konsystencja dojrzałych przetrwalników na rączniku jest twarda, rogowata.

POWSTAWANIE PRZETRWALNIKÓW W WARUNKACH HODOWLI.

Materiał wyjściowy do wyosobnienia pleśni szarej stanowiły przetrwalniki, pochodzące zarówno z pędów jak i nasion rącznika. Wypreparowane z podłoża sklerocja sterylizowano powierzchniowo alkoholem

96% 5 sekund i sublimatem 0,1% 3 sekundy, przemywano kilkakrotnie jałową wodą destylowaną i wysiewano je lub ich wycinki do probówek z pożywką agarowo-ziemniaczano-glukozową, wzbogaconą peptonem (agar 2%, glukoza 3%, pepton 0,15%, wyciąg ziemniaczany z 600 g ziemniaków, woda destylowana — uzupełniona do 1000 ml). pH pożywki przed wyjałowieniem w autoklawie (1 atm. 20 minut): około 6,5. Hodowlę prowadzono w termostacie przy 23 — 25°, bez oświetlenia.

Po 2-ch dniach od wysiewu rozpoczynał się wzrost białej, watowatej grzybni wokół inokulum, która szybko rosnąc, po 5—6 dniach pokrywała całą powierzchnię substratu i zaczynała się różnicować na powierzchni. Miejscami tworzyło się konidialne owocowanie grzyba. Poczynając od najstarszej partii grzyba powstawały przetrwalniki, które w 9-dniowych hodowlach pokrywały powierzchnię w postaci prawie kulistych tworów w wymiarach 2—6 mm × 2—3 mm. Były one początkowo biało zabarwione. Brzegi hodowli krezowato pomarszczone i odstające od szkła również nabierały charakteru przetrwalnika. Po 10 dniach hodowli powierzchnia przetrwalników zaczynała czernieć; w opisanych warunkach proces ten trwał około 2 miesiące (Fot. 3).

W zetknięciu ze ściankami probówek tworzyły się w hodowli typowe dla tego gatunku pseudosklerocja, określane jako wstępne stadium przetrwalników grzyba (J ö r g e n s e n 1948, L e m b k e 1943). Miały one postać drobnych tworów (do około 1 mm), brunatnych lub prawie czarnych, powstających na końcach zgrubiałych strzępów grzybni.

Pominąć tutaj można szczegółowy opis owocowania konidialnego charakterystycznego dla gatunku *Botrytis cinerea* P e r s. (L i n d a u 1922, S o r a u e r 1932, L e m b k e 1943), którego cechy w hodowli odpowiadały cechom obserwowanym na materiale w warunkach naturalnych. Konidia produkowane *in vitro* były jedynie nieco mniejsze (9,6—13,6 μ × × 7,2 — 9,6 μ, przeciętnie 10,8 × 8,4 μ) aniżeli w przyrodzie (8,8—16 μ × × 6,4 — 12 μ, przeciętnie 12,8 × 9,6 μ).

W hodowli znajdowano ponadto typowe dla pleśni szarej (J ö r g e n s e n 1948) mikrokonidia (*spermatia*) kształtu kulistego, bezbarwne, o średnicy 2,4 — 3,2 μ.

BUDOWA ANATOMICZNA PRZETRWALNIKÓW *BOTRYTIS CINEREA* P E R S.*)

Budowa anatomiczna przetrwalników, otrzymanych w wyżej opisanych warunkach hodowli grzyba, odpowiadała budowie wewnętrznej przetrwalników znajdowanych w przyrodzie — na nasionach i pędach rącznika. A oto zasadnicze cechy tej budowy:

Oglądany przy kilku — do kilkunastokrotnym powiększeniu przekrój poprzeczny przez przetrwalnik wykazuje wyraźne zróżnicowanie. Białawo lub żółtawo szaro zabarwioną partię wewnętrzną okrywa cienka, zewnętrzna warstwa prawie czarna, lub ciemno brunatna, wyjątkowo zaś o zabarwieniu jaśniejszym. Wewnętrzna partia wykazuje czasem

*) Sprawdzenie podanych tutaj szczegółów anatomicznych autor zawdzięcza dr W. B o r a t y ń s k i e j — adiunktowi Państw. Instytutu Naukowego Leczniczych Surowców Roślinnych w Poznaniu.

1

2

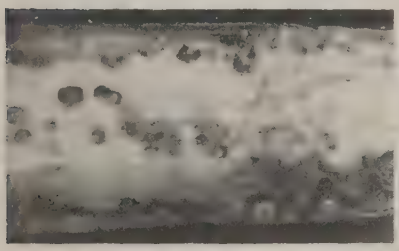
Fot. 1. Przetrwalniki *Botrytis cinerea Pers.* na nasionach rącznika.

Fot. 2. Przetrwalniki *B. cinerea* na łodydze rącznika.

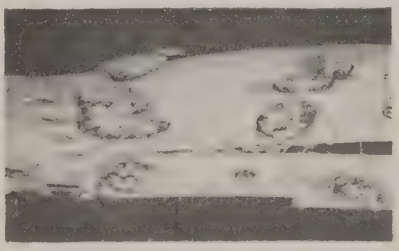
Фот. 1. Склероции *Botrytis cinerea Pers.* на семенах клещевины.

Фот. 2. Склероции *Botrytis cinerea Pers.* на стеблях клещевины.

Phot. 1. Sclerotia of the grey mould on the seeds of *Ricinus communis* L.
Phot. 2. Sclerotia of the grey mould on the stem of *Ricinus communis L.*



3



4

Fot. 3. Przetrwalniki *B. cinerea* w 1-miesięcznej hodowli na agarze ziemniaczano-glukozo-peptonowym.

Fot. 4. Przetrwalniki *B. cinerea* na łodygach rącznika w okresie wiosennym, pokryte konidiangiami.

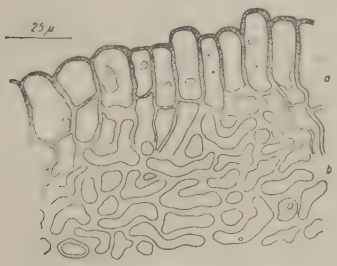
Фот. 3. Склероции *Botrytis cinerea Pers.* одномесячной культуры на картофельно-глюкозно-пептонном агаре.

Фот. 4. Склероции *Botrytis cinerea Pers.* на стеблях клещевины в весенний период покрытые конидиеносцами

Phot. 3. Sclerotia of the grey mould in the one month culture of the fungus on the glucose-potato-broth-agar.

Phot. 4. Sclerotia of the grey mould on the stem of *Ricinus communis L.* after hibernating in natural environment. The surface of the sclerotia is covered with conidiophores.

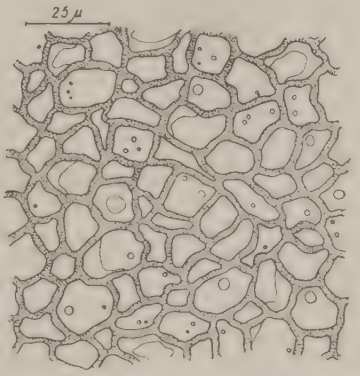
na przekroju niejednolite zabarwienie z lekko zaznaczoną smugowatością. Przekroje przetrwalnika badane mikroskopowo wskazują na budowę następującą (Rys. 1 i 2).



Rys. 1. Przekrój poprzeczny przez przetrwalnik pleśni szarej. a. zewnętrzna „korowa" partia przetrwalnika; b. wewnętrzna partia przetrwalnika (wykon. aparatem rysunkowym).

Рис. 1. Поперечный разрез через склероции *Botrytis cinerea Pers.* a — наружная часть склероции, b — внутренная часть

Fig. 1. Transverse-section of a sclerotium of the grey mould. a — cortex, b — pseudoparenchyma.



Rys. 2. Przekrój styczny do powierzchni przetrwalnika pleśni szarej poprowadzony przez zewnętrzną „korową" partię.

Рис. 2. Сиггиттальный разрез через наручный слой склероции *Botrytis cinerea* Pers.

Fig. 2. Saggital section of a cortex layer of a sclerotium of the grey mould.

Wewnętrzną partię o charakterze pseudoparenchymatycznym stanowią gęsto splecione ze sobą strzępki bezbarwnej grzybni, podzielone na komórki o świetle 3,2 — 5,6 μ, wypełnione głównie kroplami tłuszczu. Obserwowane niekiedy makroskopowo strefowania tej partii pochodzą z nierównej gęstości splecenia strzępków grzybni. Na głębokości około 50 μ od powierzchni przetrwalnika końce bezładnie splecionych strzępków stopniowo wyprostowują się w jednym kierunku, mianowicie prostopadłym do powierzchni przetrwalnika. W ten sposób, poczynając od głębokości około 30 μ, tworzą one silnie zwartą, palisadową warstwę gęsto podzielonych na komórki strzępków o grubych błonach, o świetle 5,6 — 12,8 μ. Ostatnie (zewnętrzne) komórki tych strzępków, zakończone półkulisto, tworzą powierzchnię przetrwalnika. Charakterystyczną ich cechą jest ciemno brunatne zabarwienie grubych błon komórkowych. Intensywność tego zabarwienia wzrasta w kierunku ku powierzchni przetrwalnika. To właśnie zabarwienie decyduje o prawie czarnym kolorze całego przetrwalnika. Przekrój przez te komórki poprowadzony stycznie do powierzchni, wykazuje ich przeważnie wielokątne kształty w wyniku silnego ściśnięcia strzępków w warstwie palisadowej. Opisana warstwa zewnętrzna przetrwalnika otacza go dookoła tak, że z jej charakterystyczną budową, cokolwiek tylko zwykle słabiej wyrażoną, spo-

tykamy się również u podstawy przetrwalnika, którą przyrasta on do podłoża.

Należy zaznaczyć, że podawane w literaturze opisy anatomicznej budowy przetrwalnika *Botrytis cinerea* Pers., uzupełniane rysunkami (Jörgensen 1948, Butler i Jones 1949) nie są zgodne z powyższymi obserwacjami. Zewnętrzną partię przetrwalnika stanowi wg Jörgensena „kilka warstw kanciastych, ciemno zabarwionych komórek", co znajduje wyraz w rysunkach obu wyżej wspomnianych autorów.

Sprostowanie tych pojęć znajduje uzasadnienie w tym, że cechy budowy anatomicznej przetrwalnika pleśni szarej mogą mieć nieraz znaczenie diagnostyczne.

Konidialną formę owocowania *Botrytis cinerea* Pers. łączy się często z workową formą owocowania nazwaną twardzikiem Fuckla (*Sclerotina Fuckeliana*), rozwijającą się z przetrwalników (Saccardo 1882—1891, Wolf i Wolf 1948, Naumow 1952).

W naszych dotychczasowych badaniach ani w przyrodzie ani też w zwykłych warunkach hodowli nie obserwowano powstawania workowego owocowania pleśni szarej, pasożytującej na rączniku.

Obfite tworzenie się na przetrwalnikach owocowania konidialnego, charakterystycznego dla tego gatunku, obserwowano na wiosnę (15 — 20.IV) na materiale, który przez okres zimy pozostawał na ziemi pod wpływem naturalnych warunków meteorologicznych (Fot. 4). Przetrwalniki pobudzane do rozwoju (w mokrej kamerze przy 23°), a nie poddane bezpośredniemu oddziaływaniu warunków zimy, dawały wzrost grzybni wegetatywnej i skąpe owocowanie konidialne. Dotyczyło to zarówno przetrwalników zebranych w przyrodzie, jak też i otrzymanych *in vitro*.

А. Голеня

СТАДИЯ СКЛЕРОЦИЕВ У ГРИБА *BOTRYTIS CINEREA* PERS. НА КЛЕЩЕВИНЕ

Резюме

Автор занялся исследованием стадии склероциев у гриба *Botrytis cinerea* Pers, используя для этой цели материал, собранный на клещевине (*Ricinus communis* L.).

Автор излагает наблюдения по образованию склероциев на растениях растущих в поле а также дает описание культуры гриба на агарово-картофельно-люкозной среде с добавкой пептона при pH ок. 6,5 и температуре 23 — 25°, при которой легко образуются склероций (фот. 1, 2 и 3).

Рассматривая анатомическое строение склероциев *Botrytis cinerea* Pers, автор обращает внимание на существенные разницы, выступающие между наблюдениями автора а данными цитированными в соответственной научной литературе. В частности автор нашел, что наружную, окрашенную в темный цвет, часть склероциев составляют концы гиф, расположенные перпендикулярно к поверхности склероциев, в виде палисада, с толстыми, окрашенными в темный цвет клеточными оболочкнми (рис. 1 и 2).

Наблюдения над весенним развитием склероциев показали лишь образование в изобилии конидий гриба поскольку склероции перезимовали в натуральных условиях.

A. Golenia

SCLEROTIA OF GRAY MOULD (*BOTRYTIS CINEREA* PERS.) *ON CASTOR BEAN*

Summary

The resting-stage of gray mould *(Botrytis cinerea Pers.)*, parasiting on the Castor bean plants (*Ricinus communis L.*) has been examined.

The development of the sclerotia of *Botrytis cinerea* on the host plants in natural environment and in artificial culture has been described (Phot. 1, 2 and 4).

On the potato-glucose-peptone-agar at pH ca 6,5 and 23 — 25° the formation of the sclerotia has begun already after 6 — 9 days of incubation. The sclerotia turn brown after ca 2 months (Phot. 3).

The structure of the mature sclerotia has been also studied. The outer wall, „cortex" of the sclerotium, shows a compact layer of the palisade hyphal ends with the thick, dark-coloured cell-membranes. The description given by the author differs with this of Schnegg (Jörgensen 1948) and Brefeld (Butler a. Jones, 1949). The central part of the sclerotium is formed from pseudoparenchyma tissue of interwoven colourless hyphae (see fig. 1 and 2).

The fungus, hibernating in the form of sclerotia on castor bean stems, developed in the spring numerous conidiophores. The perfect stage has not been observed.

LITERATURA

1. Butler E. J., Jones S. G., 1949: Plant Pathology — Mac Millan Co, London.
2. Jörgensen A. (Hansen A.), 1948: Micro-organisms and Fermentation, Ch. Griffin a. Co, London.
3. Kaznowski L., 1950: Rącznik, P. W. R. i L., Warszawa.
4. Lembke A., 1943: Ergebnisse der theoretischen und angewandten Mikrobiologie, B. I. Systematik der Schimmelpilze (H. Delitsch). J. Neumann, Neudamm.
5. Lindau G., 1922: Kryptogamenflora für Anfänger, II. B. 2 Abt. J. Springer, Berlin.
6. Naumow N. A., 1952: Bolezni sielskochozjajstwiennych rastienij, Sielchozgiz, Moskwa — Leningrad.
7. Saccardo P. A., 1882—1931: Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum. *Ann. Arbor, Michigan,* **1** : 25.
8. Sorauer P. (Appel A.), 1932: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, III. B. Die pflanzlichen Parasiten, II. T., P. Parey, Berlin.
9. Wolf F. A., Wolf F. T., 1948: The Fungi, J. Wiley a. S., New York, Vol. I.

RECENCJE I DYSKUSJE

W sprawie artykułu J. Horoszewicza „Wpływ chloromycetyny na zmienność *E. coli* ze szczególnym uwzględnieniem formy *L*" (Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, tom VI Nr 1, 1955).

W polskiej literaturze mikrobiologicznej opublikowano dotąd kilka prac dotyczących cyklu *L* bakterii. Artykuły przeglądowe ogłosiła Kłyszejko w *Post. Hig. i Med. Dośw.* tom VII z. 3/4, 1953 oraz Kunicki-Goldfinger w *Kosmosie* Nr 3 z 1953 r. Problemowi temu poświęca również wiele uwagi Kunicki-Goldfinger w swej ostatniej pracy o „Zmienności bakterii" opublikowanej w *Acta Microbiol. Polon.*, tom III No 3, 1954 r.

Jakkolwiek badania nad formami *L* bakterii wykonywane są już w Polsce w kilku zakładach mikrobiologii, rezultaty swych obserwacji opublikował dotąd jedynie J. Horoszewicz w *Acta Microbiol. Polon.*, tom II No 2/3, 1953 r. i w *Med. Dośw. i Mikrobiol.*, tom VII z. 1, 1955 r.

W związku z tym ostatnim artykułem nasunęło mi się kilka krytycznych uwag dotyczących zarówno części przeglądowej pracy, jak i wyników badań nad powstawaniem form *L* u *E. coli* pod wpływem chloromycetyny.

Artykuł ten jest bezsprzecznie cennym wkładem do literatury omawiającej zmiany morfologiczne zachodzące po zadziałaniu na bakterie chloromycetyną. Zawiera on jednak pewną ilość niejasnych, nawet trudnych do przyjęcia sformułowań.

Zasadnicze zastrzeżenie budzi, moim zdaniem, szerokie a równocześnie bardzo niesprecyzowane zdefiniowanie form *L* bakterii. Autor wprawdzie na wstępie podaje definicję form *L*, według której do tego stadium rozwojowego zalicza postacie upodobnione do zarazków bydlęcej pleuropneumonii, jednak opisywane przez niego w dalszej części referatu „formy *L*" są zupełnie niepodobne do mikroorganizmów zarazy płucnej bydła. Prawdopodobnie autor oparł się na starszych pracach dotyczących organizmów pleuropneumonii, według których, polimorfizm tej grupy był praktycznie nieograniczony. Dziś wiemy jednak, że hodowle tych drobnoustrojów, zarówno na podłożach płynnych jak i stałych, składają się tylko z trzech typów elementów, a to: ziarenek o średnicy około 200 mμ, postaci kulistych o kształcie dość regularnym i średnicy do 50 μ oraz, i to nie zawsze, z nitek bardzo różnej długości. Wszystkie natomiast inne nieregularne twory, czy też trójkąty i kwadraciki o których pisze Horoszewicz, powstawały w wyniku stosowania brutalnej techniki sporządzania preparatów, przy której delikatne mikroorganizmy pleuropneumonii ulegały daleko idącej deformacji.

O ile więc autor stwierdził, że u *E. coli* powstają pod wpływem chloromycetyny postacie dzdzownicowate, wężowate, gruszkowate, wieloboczne, maczugowate i inne, to stanowczo nie można ich uznać za podobne do zarazków plenuropneumonii. Tym bardziej gdy takie formy wchodzą w skład mikrokolonii, to trudno zgodzić się z tym by były to kolonie typu *L*, jak chce autor.

Gdybyśmy bowiem nawet stanęli na stanowisku reprezentowanym swego czasu przez E. Klieneberger (J. gen. Microbiol., tom V Nr 3, 1951), według której formami *L* są bardzo różnorodne postacie morfologiczne (często podobne do opisywanych przez J. Horoszewicza), przechodzące charakterystyczny cykl rozwojowy, to i w tym przypadku skupienia tych różnorodnych postaci, otrzymane przez autora omawianego artykułu, nie mogłyby być uznane za mikrokolonie typu *L*. Definicja tych ostatnich jest zbyt wyraźna, by udało się podciągnąć pod nią kolonie Horoszewicza.

Zgodnie z tą definicją, kolonia typu *L* składa się z drobnych postaci ziarnistych otoczonych tworami kulistymi różnej wielkości, często zupełnie zwakuolizowanymi. W pewnych przypadkach ilość tych form kulistych może być zresztą znikoma. Nie stwierdza się natomiast nigdy postaci nitkowatych.

Podanemu tu opisowi stanowczo nie odpowiadają „kolonie *L*" J. Horoszewicza.

Trudno się również zgodzić z ryzykownym stwierdzeniem autora artykułu, że powstawanie form *L* bakterii wywołują „wszystkie wpływy biologiczne, fizyczne i chemiczne jakie są w stanie wprowadzić zaburzenia w procesie rozmnażania przy równoczesnym gromadzeniu produktów metabolizmu".

Wydaje mi się, że nikt dotychczas nie badał „wszystkich wpływów biologicznych, fizycznych i chemicznych", które mogłyby powodować zaburzenia w procesie rozmnażania bakterii. Nie wiem również na jakiej podstawie autor twierdzi, że te różnorodne postacie, powstające pod wpływem niemniej różnorodnych czynników, charakteryzują się gromadzeniem produktów metabolizmu. Przecież wszystkie żywe komórki mogą gromadzić pewne produkty metabolizmu wewnątrz, inne natomiast wydalać na zewnątrz. Czy autor sądzi, że formy *L* bakterii zupełnie nie wydalają produktów przemiany materii?

Wracając jeszcze do czynników, które według J. Horoszewicza powodują przechodzenie bakterii w formy *L*, chciałbym zaznaczyć, że tylko niektóre z wymienionych np. penicylina, rzadziej inne antybiotyki, pewne aminokwasy i ewentualnie surowica swoista i fagi, wpływają na tworzenie mikrokolonii *L*. Inne natomiast prowadzą tylko do powstawania w hodowlach postaci kulistych, nitkowatych itp., które nigdy nie dają kolonii *L*. Autor artykułu nie wprowadza jednak tego istotnego rozróżnienia.

Wynika to prawdopodobnie stąd, że za formy *L* uważa on wszystkie zmienione morfologicznie postacie, które zgodnie z nomenklaturą stosowaną przez Dienesa należałoby nazywać dużymi ciałami, czy też jak chcą badacze radzieccy, formami lub komórkami olbrzymimi, lub o ile mają one inny kształt, po prostu postaciami nitkowatymi, owalnymi, gruszkowatymi itp.

Takie stanowisko nie przesądza bowiem zupełnie o tym, czy z tych postaci powstają mikrokolonie *L*, czy też nie. Wiadomo natomiast, że wiele z tych różnorodnych form ma charakter degeneracyjny lub, o ile nie, to powstają z nich drogą rewersji formy wyjściowe bez przejścia przez stadium kolonii *L*.

Na zakończenie, chciałbym zwrócić jeszcze uwagę na poważny błąd niedopuszczalny w tego rodzaju artykułach.

Autor omawianej pracy podaje wprawdzie wykaz literatury z której korzystał, w tekście jednak prawie zupełnie się na nią nie powołuje. Nie wiemy według jakiego

badacza „ciałka elementarne form *L* odpowiadają", jak pisze Horoszewicz „skupieniom chromatyny".

Wydaje mi się jednak, że ci którzy zajmowali się tym zagadnieniem jak np. Klieneberger, Tulasne (wg L. Dienesa: *Bacterial. Rev.*, tom 15 z. 4, 1951) stwierdzili, że ziarnistości typu *L* są skupieniami chromatyny otoczonej wąską warstwą cytoplazmy. Czyżby natomiast autor traktował je jako „nagie" jądro bez plazmy?

Nie spotkałem się również w znanej mi literaturze ze stwierdzeniem, jakoby kolonie typu *R* pojawiały się jako pierwsze przy tworzeniu form *L*. Zdaniem Horoszewicza, o ile „czynnik szkodliwy jest o małym natężeniu i działa krótko" powstają kolonie *R*. „Jeżeli teraz zwiększymy natężenie lub długotrwałość działania bodźca, nici i komórki puchną, co już jest właściwie przejściem do postaci *L*". Jest to chyba tylko hipoteza oparta na obserwacjach własnych autora, a o ile tak, należało o tym wspomnieć.

I jedna jeszcze drobna uwaga. Nie róbmy krzywdy polskim badaczom, tym bardziej o ile są oni znani dobrze, nie tylko w kraju lecz i zagranicą. Autor pisze, że „jak wykazały prace Boivina, Robinow i Tulasne'a w bakteriach można wykazać podział jądra przed zwykłym podziałem komórki". Należało tu wspomnieć, że zagadnieniem tym już wcześniej zajmował się i zjawisko to wyczerpująco opisał polski uczony Badian.

W sumie artykuł J. Horoszewicza, mimo pewnych sformułowań z którymi trudno zgodzić się, zawiera jednak wiele interesujących obserwacji nad wpływem chloromycetyny na zmienność pałeczek okrężnicy.

Z. Kwiatkowski

Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS, Lublin

SPIS TREŚCI

str.

D. Iwanicka i Z. Kwiatkowski: Obserwacje nad powstawaniem form *L* u *Shigella dysenteriae* 79
Z. Kwiatkowski: Mikroorganizmy grupy pleuropneumonii . . 85
Wł. Kunicki-Goldfinger, St. Chariasz i T. Pudo: Hemolizyny *Escherichia coli* 107
B. Dudziak: Kiełkowanie i wzrost ameb w zależności od pokarmu bakteryjnego 115
Wł. Kunicki-Goldfinger i A. Marzec: Wpływ toksyn bakteryjnych na *Paramaecium* 127
H. Burzyńska: Mikroflora niektórych warzyw rynku warszawskiego 131
E. Czerwińska i R. Kowalik: Działanie etylenobisdwutiokarbaminianu dwusodowego (nabamu) i etylenobisdwutiokarbaminianu cynkowego (zinebu) na kilka grzybów niedoskonałych oraz na bakterie wiążące azot atmosferyczny 141
A. Golenia: Przetrwalnikowe stadium pleśni szarej (*Botrytis cinerea* Pers.) na rączniku 153
Recenzje i dyskusje 159

СОДЕРЖАНИЕ

Д. Иваницка и З. Квятковски: Наблюдения над образованием форм L у *Shigella dysenteriae* 79
З. Квятковски: Микробы группы перипневмонии (обзор) . . 85
Вл. Крницки-Гольфингер, С. Хариаш и Т. Пудо: Гемолизины кишечной палочки 107
Б. Дудзяк: Прорастание и рост амеб в зависимости от бактериального корма 115
Вл. Куницки-Гольдфингер, С. Хараши и Т. Пудо: Гемолиальных токсинов на *Paramaecium* 127
Г. Бужинска: Микрофлора некоторых овощей продаваемых на варшавских базарах 131
Е. Червинска и Р. Ковалик: Действие двунатриевой соли этиленобисдвутиокабаминовой кислоты (набама) и этиленобисдвутиокарбамината цинка (зинеба) на несколько несовершенных грибов а также на бактерии связывающие атмосферный азот . . . 141
А. Голена: Стадия склероциев у груба у груба *Botrytis cinerea* Pers 153

CONTENTS

Page
D. Iwanicka and Z. Kwiatkowski: Some observations on the *L* forms in *Shigella* 79
Z. Kwiatkowski: Pleuropneumonialike organisms (a review) . 85
Wł. Kunicki-Goldfinger, St. Chariasz and T. Pudo: The haemolysin of *Escherichia coli* 107
B. Dudziak: The influence of the temperature and of the bacterial environment on the excystment and growth of soil — amoebae . . 115
Wł. Kunicki-Goldfinger and A. Marzec: The influence of bacterial exotoxines on *Paramaecium* 127
H. Burzyńska: The microflora on some vegetables in Warsaw market 131
E. Czerwińska and R. Kowalik: The influence of ethylenbisdithiocarbaminates (Zineb and Nabam) on some *Fungi imperfecti* and on nitrogen-fixing bacteria 141
A. Golenia: Sclerotia of gray mould (*Botrytis cinerea* Pers) . . 153

Cena zł 10.—